

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen
und Marburg GmbH, Standort Marburg

**Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion
unter spezifischer Immuntherapie mit inhalativen
Allergenen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christian Möbs
aus Lahn-Gießen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 1. Juni 2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent:	PD Dr. Wolfgang Pfützner
Koreferent:	Prof. Dr. Harald Renz

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Allergische Erkrankungen.....	1
1.2 Allergietypen	1
1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp oder Anaphylaktischer Reaktionstyp)	1
1.2.2 Typ-II-Reaktion (Zytotoxischer Reaktionstyp)	2
1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplextyp)	2
1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Spättyp).....	2
1.3 Epidemiologie allergischer Erkrankungen	2
1.4 Pathophysiologie der Typ-I-Allergie.....	4
1.5 Birkenpollenallergie.....	6
1.6 Humorale Immunantwort der Soforttypallergie	6
1.6.1 IgE.....	7
1.6.2 IgG	7
1.6.3 IgA.....	8
1.7 T-Lymphozyten im Kontext allergischer Typ-I-Reaktionen	8
1.7.1 T-Helfer-Zellen und assoziierte Zytokine in der Pathogenese der allergischen Soforttypreaktion	9
1.7.2 Regulatorische T-Zellen	13
1.8 Therapieformen bei allergischer Erkrankung	16
1.8.1 Symptomatische Behandlungsformen	17
1.8.2 Experimentelle Behandlungsformen	19
1.8.3 Spezifische Immuntherapie	20
2 Material	24
2.1 Patientenmaterial	24
2.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen	24
2.3 Zytokine und Proteinantigene.....	24
2.4 Chemikalien	24
2.5 Puffer und Kulturmedien	25
2.6 Antikörper.....	26

2.6.1	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen	26
2.6.2	Antikörper für Zellkultur	26
2.7	Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik.....	26
2.8	Verbrauchsartikel.....	26
2.9	Geräte.....	27
2.10	Software.....	28
3	Methoden	29
3.1	Patienten.....	29
3.1.1	Einschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie	29
3.1.2	Ausschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie	29
3.2	Spezifische Immuntherapie und Studiendesign.....	30
3.3	Klinische Evaluation	31
3.3.1	Klinischer Symptomscore.....	31
3.3.2	Hautpricktest	31
3.3.3	Nasale Allergenprovokation	32
3.3.4	Symptomatische Medikation	32
3.4	Serologische Diagnostik	32
3.5	Zelluläre Diagnostik	33
3.5.1	Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	33
3.5.2	Zellzahlbestimmung	34
3.5.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
3.5.4	Generierung allergenspezifischer T-Zelllinien.....	34
3.5.5	Bestimmung der Zellproliferation und Antigenspezifität	35
3.5.6	Frequenzanalyse allergenspezifischer Zellen mittels ELISPOT	35
3.5.7	Isolierung humaner Zellpopulationen mittels magnetischer Zellseparation	36
3.5.8	Funktionelle Analyse Bet v 1-spezifischer, IL-10-produzierender Zellen	37
3.5.9	Durchflusszytometrie.....	38
3.6	Statistik	39
4	Ergebnisse.....	41
4.1	Auswirkung spezifischer Immuntherapie auf Birkenpollenallergiker	41
4.1.1	Klinische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie	41
4.1.2	Veränderung humoraler Mediatoren der allergischen Immunantwort ...	43

4.1.3	Frequenzen Bet v 1-spezifischer T-Zellpopulationen im Verlauf der spezifischen Immuntherapie	48
4.1.4	Induktion Bet v 1-spezifischer, Interleukin-10-produzierender T-Zellen unter spezifischer Immuntherapie	51
4.1.5	Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen unter spezifischer Immuntherapie	52
4.1.6	Charakterisierung induzierbarer, Bet v 1-spezifischer, Interleukin-10-sezernierender Tr1-Zellen	54
4.1.7	Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie auf die Anzahl CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} regulatorischer T-Zellen	57
4.2	Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf Birkenpollenallergiker und gesunde Probanden.....	59
4.2.1	Der Schweregrad allergischer Symptome unter natürlicher Allergenexposition.....	59
4.2.2	Änderungen humoraler Mediatoren während saisonaler Birkenpollenexposition	60
4.2.3	Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen unter natürlicher Allergenexposition.....	62
4.2.4	Frequenzanalyse induzierbarer, Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T-Zellen unter natürlicher Allergenexposition	64
4.2.5	Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen während saisonaler Allergenexposition.....	65
4.2.6	Frequenzanalyse CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} regulatorischer T-Zellen unter natürlicher Allergenexposition	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Einfluss spezifischer Immuntherapie auf immunologische Mechanismen bei Typ-I-Allergien	68
5.1.1	Veränderung der klinischen Symptomatik unter spezifischer Immuntherapie	69
5.1.2	Modulation der Antikörperantwort durch spezifische Immuntherapie ...	70
5.1.3	Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf T-Helfer-Zellen.....	73
5.1.4	Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf regulatorische T-Zellen..	76
5.1.5	Weitere immunmodulatorische Effekte der spezifischen Immuntherapie.....	82
5.2	Immunregulatorische Interaktionen im Kontext der spezifischen Immuntherapie	83
6	Literaturverzeichnis.....	86

7	Ehrenwörtliche Erklärung	112
8	Schriftenverzeichnis.....	113
9	Verzeichnis akademischer Lehrer.....	115
10	Danksagung	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AEC	Aminoethylcarbazol
APC	a) engl.: <i>antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle) b) Allophycocyanin
BPA	Birkenpollenallergen
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	engl.: <i>cyclic adenosine monophosphate</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungskluster)
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
cpm	engl.: <i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
CTLA	engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte antigen</i> (zytotoxisches T-Lymphozytenantigen)
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNCG	Dinatriumcromoglicat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELISPOT	engl.: <i>enzyme-linked immunospot assay</i> (enzymgekoppelter Immunospottest)
et al.	lat.: et alii (und andere)
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung; Durchflusszytometrie)
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	engl.: <i>forkhead winged-helix transcriptional factor Box p3</i> (Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3)
FSC	engl.: <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	a) Normalfallbeschleunigung (9,81 m/s ²)

	b) Gramm
GATA-3	GATA-bindendes Protein 3
GITR	engl.: <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i> (Glukokortikoid-induzierter Tumornekrosefaktor-Rezeptor)
GITRL	GITR-Ligand
Gy	Gray
HLA	engl.: <i>human leucocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iso-K	Isotypkontrolle
iTreg-Zelle	induzierbare regulatorische T-Zelle
k	kilo
Kap.	Kapitel
l	Liter
m	a) milli ($\times 10^{-3}$) b) Meter c) Monat
M	Molar
MACS	engl.: <i>magnetic cell sorting</i> (magnetische Zellseparation)
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute(n)
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n	a) engl.: <i>number</i> (Anzahl) b) nano ($\times 10^{-9}$)
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NPT	nasaler Provokationstest
nTreg-Zelle	natürliche regulatorische T-Zelle
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PHS	engl.: <i>pooled human serum</i> (gepooltes Humanserum)
RCA	Rhinokonjunktivitis allergica
rpm	Rotationen pro Minute
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	sublinguale Immuntherapie
s.o.	siehe oben

sog.	so genannt
spp.	lat.: species pluralis
SQ-Einheiten	standardisierte Qualitätseinheiten
SSC	engl.: <i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i> (Signalüberträger und Transkriptionsaktivator)
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
T-bet	engl.: <i>T-box expressed in T cells</i> (T-Box exprimiert in T-Zellen)
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
Teff-Zelle	Effektor-T-Zelle
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg-Zelle	regulatorische T-Zelle
Tr1-Zelle	Typ-1-regulatorische T-Zelle
U	engl.: <i>units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnung (z.B. Eigennamen) sind *kursiv* dargestellt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abb. 1: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Prävalenz allergischer Erkrankungen.
- Abb. 2: Regulation und Effektormechanismen der allergischen T-Helfer (Th) 2-Antwort.
- Abb. 3: Die dichotome T-Helfer (Th)-Differenzierung nach Allergenexposition.
- Abb. 4: Differenzierung CD4⁺ regulatorischer T-Zellen im Thymus und in der Peripherie.
- Abb. 5: Therapiemöglichkeiten bei allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp.

Material

- Abb. 6: Behandlungsplan mit verkürzter Aufdosierung für ALK-depot SQ Pollen bei allergischer Rhinitis.
- Abb. 7: Zeitlicher Ablauf des Studienprotokolls der spezifischen Immuntherapie (SIT).
- Abb. 8: Klassisches Verteilungsmuster nach Dichtegradienten-Zentrifugation.
- Abb. 9: Schematische Darstellung eines ELISPOTs.

Ergebnisse

- Abb. 10: Das klinische Ansprechen der Birkenpollenallergiker auf die spezifische Immuntherapie (SIT) mit Birkenpollenallergen (BPA)-Extrakt.
- Abb. 11: Der Verlauf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer IgE- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 12: Spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 13: Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 14: Das Verhältnis Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 15: Die Beziehung zwischen der Reaktion im Hautpricktest und den Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischen Antikörpern.
- Abb. 16: Bet v 1-spezifische IgA- und IgG-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 17: Allergenspezifische IgG- und IgG4-Serumkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 18: Die quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens.

- Abb. 19: Die Produktion der Zytokine Interleukin (IL)-5 und Interferon (IFN) γ durch CD4⁺ Zellen.
- Abb. 20: Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 21: Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 1-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT).
- Abb. 22: Die Induktion Bet v 1-spezifischer, Interleukin (IL)-10-produzierender Zellen durch die spezifische Immuntherapie (SIT).
- Abb. 23: Die Frequenzen der Interleukin (IL)-5-, Interferon (IFN) γ - und IL-10-produzierenden Zellen nach Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulation.
- Abb. 24: Die durch die spezifische Immuntherapie (SIT) induzierten Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Th1-Zellen.
- Abb. 25: Die durch die spezifische Immuntherapie (SIT) induzierten Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen.
- Abb. 26: Die supprimierende Aktivität Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen.
- Abb. 27: Die supprimierende Wirkung des Zytokins Interleukin (IL)-10.
- Abb. 28: Die durchflusszytometrische Charakterisierung Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen.
- Abb. 29: Der Einfluss der Kryokonservierung auf die durchflusszytometrische Analyse CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorischer T (Treg)-Zellen.
- Abb. 30: Die Frequenz CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorischer T (Treg)-Zellen im Verlauf der spezifischen Immuntherapie (SIT).
- Abb. 31: Der Schweregrad der allergischen Erkrankung unter natürlicher Birkenpollenexposition.
- Abb. 32: Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen.
- Abb. 33: Die Auswirkung saisonaler Pollenexposition auf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen.
- Abb. 34: Die Veränderungen im Verhältnis Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer IgG4- zu IgE-Antikörperkonzentrationen unter natürlicher Allergenexposition.
- Abb. 35: Die saisonalen Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen.
- Abb. 36: Die durch saisonale Allergenexposition induzierten Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 1-Zellen.
- Abb. 37: Die Auswirkung natürlicher Allergenexposition auf die Frequenz Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen.
- Abb. 38: Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf das Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th)2- zu Th1-Zellen.

- Abb. 39: Die Auswirkung saisonaler Allergenexposition auf das Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th)2- zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen.
- Abb. 40: Der Einfluss saisonaler Allergenexposition auf die Anzahl CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorischer T (Treg)-Zellen.

Tabellenverzeichnis

Methoden

- Tab. 1: Kontraindikationen zur subkutanen spezifischen Immuntherapie mit Allergenen.

Ergebnisse

- Tab. 2: Patientencharakteristik und klinischer Zustand der in die Studie inkludierten Birkenpollenallergiker vor Einleitung der spezifischen Immuntherapie.

Zusammenfassung

Die Inzidenz respiratorischer Allergien hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in den westlich geprägten Industriestaaten kontinuierlich zugenommen. Das wesentliche Merkmal einer Überempfindlichkeitsreaktion gegen Aeroallergene wie Pollen, Tierepithelien oder Hausstaubmilben ist die Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper, die rezeptorvermittelt an Effektorzellen der allergischen Entzündung gebunden werden. Durch Allergenkontakt kommt es zur Quervernetzung der auf der Oberfläche von basophilen und eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper mit konsekutiver Zellaktivierung und Freisetzung von Histamin sowie weiterer proinflammatorischer Mediatoren. Diese Entzündungsmediatoren führen schließlich zu IgE-vermittelten Typ-I-Reaktionen wie Rhinokonjunktivitis und Asthma bronchiale.

Seit fast einem Jahrhundert wird die spezifische Immuntherapie (SIT), auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, zur Behandlung von Typ-I-Reaktionen eingesetzt. Nach wie vor stellt die SIT die einzige, kausale Behandlungsform dar, die in der Lage ist, den natürlichen Krankheitsverlauf von Soforttypallergikern zu beeinflussen. In zahlreichen klinischen Studien wurde neben der kurativen Wirksamkeit auch der präventive Nutzen einer SIT bei der Behandlung allergischer Atemwegserkrankungen belegt. Allerdings sind die der SIT zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen, die zur Induktion und Aufrechterhaltung immunologischer Allergentoleranz führen, noch nicht abschließend aufgeklärt.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der SIT auf zelluläre und humorale Immunparameter in einem Kollektiv von 15 Birkenpollenallergikern über den Verlauf einer dreijährigen Therapie mit Birkenpollenextrakt untersucht. Es wurde ein engmaschiges, longitudinales Studiendesign gewählt, das den Vergleich zwischen unterschiedlichen Abschnitten der SIT wie Einleitungs- und Erhaltungsphase bzw. innerhalb der Birkenpollenflugsaison und außerhalb natürlicher Allergenexposition gelegener Zeitpunkte ermöglichte. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beinhaltet in diesem Zusammenhang die Abgrenzung SIT-induzierter Veränderungen von den immunologischen Modifikationen, die auf natürliche, saisonale Pollenexposition zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck wurden der Gruppe hyposensibilisierter Patienten vergleichend Kontrollpopulationen mit ausschließlich symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern und gesunden Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie gegenübergestellt.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass die SIT-vermittelte Toleranzinduktion eine ausgeprägte zeitliche Dynamik aufweist. So sind verschiedene zelluläre und humorale Faktoren phasenabhängig in unterschiedlichem Maße an der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung allergenspezifischer Toleranz beteiligt. Klinisch führte die SIT bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten bereits in der ersten Pollenflugsaison nach Therapiebeginn zu einer signifikanten Reduktion und im weiteren Behandlungsverlauf zur anhaltenden Verbesserung allergischer Beschwerden. Entsprechende Veränderungen der allergischen Reaktionsfähigkeit konnte dagegen durch eine ausschließlich symptomatische Medikation nicht erreicht werden.

Die Analysen allergenspezifischer T-Zellfrequenzen zeigten sequentielle, durch die SIT induzierte Veränderungen mit einer frühzeitigen, im weiteren Verlauf jedoch transienten Induktion Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen. Die größte Tr1-Zellzunahme fand sich im ersten Jahr der Therapie während der natürlichen Allergenexposition, gleichzeitig zum typischen Anstieg allergenspezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen in der Birkenpollensaison. In Kokultivierungsversuchen konnte die supprimierende Aktivität der Tr1-Zellen nachgewiesen werden, welche über IL-10-abhängige Mechanismen vermittelt wurde und in direkter Abhängigkeit zur ihrer Zellzahl stand. Dagegen zeigte die Frequenz Foxp3⁺ regulatorischer T-Zellen, ermittelt durch das Expressionsmuster der Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD127, weder während saisonaler Allergenexposition noch durch die SIT induzierte Veränderungen.

Bemerkenswert waren auch die durch die SIT vermittelten Modifikationen allergenspezifischer Th-Zellen. So kam es in den SIT-therapierten Patienten gegen Ende des ersten Behandlungsjahres zu einer Verschiebung der Th2-dominierten zu einer Th1-medierten Immunantwort. Es zeigte sich somit im ersten Behandlungsjahr eine ausgeprägte Dynamik bei den Bet v 1-spezifischen T-Zellsubpopulationen. Allerdings ließen sich im weiteren Verlauf der SIT auch zu Zeiten natürlicher Pollenexposition nur noch reduzierte Frequenzen allergenspezifischer T-Zellen detektieren, möglicherweise die Folge einer Induktion peripherer T-Zelltoleranz.

Der Einfluss der SIT auf die humorale Immunantwort war durch bereits ab dem dritten Behandlungsmonat kontinuierlich zunehmende Serumspiegel birkenpollenspezifischer IgG4-Antikörper gekennzeichnet. Eine ähnliche Induktion spezifischer IgG4-Antikörper konnte in der ausschließlich symptomatisch behandelten sowie der gesunden Kontrollpopulation nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den allergenspezifischen IgE- und IgA-Antikörperkonzentrationen keine Unterschiede zwischen den drei Probandenkollektiven.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen somit, dass die SIT-vermittelte Toleranzinduktion bei Typ-I-Allergien auf differenzierten, multifaktoriellen immunregulatorischen Mechanismen beruht.

Summary

Over the past decades the incidence of respiratory allergies in industrialized countries has risen continuously. Anaphylactic reactions against aeroallergens like pollen, pet dander or house dust mites are characterized by the production of allergen-specific IgE antibodies, which are bound by specific receptors. Cross-linking of these receptors on the surface of effector cells such as basophilic and eosinophilic granulocytes or mast cells by allergen contact results in consecutive cell activation with the release of histamine and other proinflammatory mediators. These mediators are responsible for the development of IgE-mediated immediate type reactions like allergic rhinitis or bronchial asthma.

Specific immunotherapy (SIT), also termed hypo- or desensitization, is known for almost a century as a treatment for immediate type reactions. SIT is the only causative therapy, which is also able to modulate the natural course of respiratory allergies. Both the curative and preventive effect of SIT was demonstrated in various clinical trials. Although the clinical efficacy of SIT is well-established, the immunological mechanisms leading to induction and maintenance of allergen tolerance are still focus of intensive research.

To assess the impact of SIT on humoral and cellular immune parameters a cohort of 15 patients allergic to birch pollen was studied during SIT with birch pollen extract. The closely meshed, long-term analysis comprised three years of therapy with emphasis on the induction and maintenance phase as well as on comparing periods during and out of birch pollen season. To distinguish between immunological modifications induced by SIT or natural birch pollen exposure two control groups were included consisting of subjects allergic to birch pollen treated only symptomatically and healthy non-allergic volunteers without manifestation of an IgE-mediated allergy.

A major finding was that tolerance induction by SIT is characterized by a distinct temporal dynamic resulting in differential induction of cellular and humoral parameters, which are involved in recovery and maintenance of allergen-specific tolerance. Clinically, SIT resulted in a significant reduction of allergic symptoms in all patients already in the first pollen season after SIT induction, which persisted during the further observation period. In contrast, allergic individuals only treated symptomatically did not experience a similar relief of symptoms.

Analysis of allergen-specific T cell frequencies pointed to sequential changes induced by SIT with an early, but transient induction of Bet v 1-specific type 1 regulatory T (Tr1) cells. The highest increase was found during natural allergen exposure, paralleling the typical rise of allergen-specific T helper (Th) 2 cells in the birch pollen season. Coculture assays revealed the suppressive activity of Tr1 cells, mediated by IL-10- and in a cell number-dependent manner. In contrast, Foxp3⁺ regulatory T cells characterized by the expression pattern of the surface markers CD4, CD25 and CD127 remained relatively constant both during the different phases of SIT and in and out of the pollen season.

Other remarkable findings were the SIT-induced modifications in allergen-specific Th cell subsets with SIT-treated patients experiencing a shift of the Th2-dominated to a Th1-mediated immune response. Thus, pronounced dynamic changes among Bet v 1-specific T cell subsets

were noticed in the first year of SIT. However, no substantial frequencies of allergen-specific T-cells were detected later on during the further treatment, even when patients were exposed to natural pollen allergens, presumably as a consequence of the induction of peripheral T cell tolerance.

Humoral alterations induced by SIT became evident by the third month of therapy through continuously rising birch pollen-specific IgG4 serum concentrations, while in both healthy controls and birch pollen allergic subjects not treated by SIT the amount of allergen-specific IgG4 antibodies remained unchanged. By contrast, allergen-specific IgE and IgA antibody concentrations did not show differences between the three cohorts.

These results thus show that SIT-mediated tolerance induction in allergic patients is based on differentiated, multi-factorial immunoregulatory mechanisms.

1 Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

Das menschliche Immunsystem muss permanent zwischen harmlosen und pathologisch relevanten Antigenen unterscheiden, um unnötige oder gegen sich selbst gerichtete Immunantworten zu vermeiden (Akdis, 2006a; Van Parijs und Abbas, 1998). Auslöser einer Allergie sind Antigene, sog. Allergene (King et al., 1994; Traidl-Hoffmann et al., 2009), welche im Gegensatz zu gesunden Individuen von Allergikern als immunogene, potentiell gefährliche Stoffe erkannt werden und gegen die eine Abwehrreaktion initiiert wird. Bei einer Allergie handelt es sich somit um eine immunologische Unverträglichkeitsreaktion gegen spezifische, nicht-pathogene Umweltstoffe. Je nach Art der allergischen Reaktion sowie des Effektororgans können unterschiedliche Symptome wie Rhinokonjunktivitis, Sinusitis, Asthma bronchiale, Ekzeme, Angioödem, Urtikaria, gastrointestinale Beschwerden (Erbrechen, Diarrhoe) oder Herz-Kreislauf-Reaktionen bis hin zur Bewusstlosigkeit bzw. kardialen Arrest auftreten.

Der Begriff "Allergie" wurde 1906 erstmals von dem österreichischen Pädriater Clemens von Pirquet in die Medizin eingeführt. Ausgehend von seinen klinischen Studien auf dem Gebiet der Infektiologie und Immunologie verstand er darunter ganz allgemein eine Veränderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus in zeitlicher, quantitativer und qualitativer Hinsicht. Er wies zu diesem Zeitpunkt schon darauf hin, dass die Veränderung der Reaktionsfähigkeit dabei nicht nur von äußeren Substanzen (Allergenen), sondern auch von inneren, organismuseigenen Faktoren abhängt (Huber, 2006). Er unterschied somit schädliche Überreaktionen von nützlichen Reaktionen des Immunsystems.

1.2 Allergietypen

Die klinische Ausprägung von Allergien hängt von der Art der Immunantwort (Effektormechanismus) sowie der Beschaffenheit des auslösenden Allergens ab. Daher wurden die allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen ursprünglich aufgrund ihrer Effektormechanismen in drei auf humoralen Faktoren beruhenden Reaktionen und eine primär zellulär vermittelte Immunantwort eingeteilt (Coombs und Gell, 1975).

1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp oder Anaphylaktischer Reaktionstyp)

Bei der Soforttypreaktion handelt es sich um eine Überempfindlichkeitsantwort auf Umweltantigene wie Pollen, Tierepithelien, Hausstaub, Nahrungsmittel, Insektengift oder Arzneimittel. Im Rahmen einer Sensibilisierungsphase wird die Bildung spezifischer, gegen das Allergen gerichteter Immunglobulin (Ig)E-Antikörper induziert. Bei erneutem Allergenkontakt kommt es schließlich meist innerhalb weniger Minuten zu IgE-vermittelten allergischen Reaktionen wie Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, Erbrechen oder Diarrhoe sowie Herz-Kreislaufversagen (Schock) (vgl. Kap. 1.4).

1.2.2 Typ-II-Reaktion (Zytotoxischer Reaktionstyp)

Eine allergische Reaktion vom Typ II tritt z.B. bei der Applikation von Arzneistoffen oder bei bestimmten Autoimmunerkrankungen (z.B. Myasthenia gravis oder autoimmune hämolytische Anämie) auf. Es handelt sich um eine sehr seltene Reaktion, bei der sich IgG- oder vereinzelt auch IgM-Antikörper spezifisch gegen Oberflächenstrukturen körpereigener Zellen richten. Nach Aktivierung des Komplementsystems erfolgt schließlich die Bindung von IgM-Antikörpern an Komplementrezeptoren bzw. die direkte Bindung der IgG-Antikörper an Fc-Rezeptoren von Phagozyten oder natürlichen Killer (NK)-Zellen, wodurch die Lyse antigentrager Zellen vermittelt wird.

1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplextyp)

Bei der Reaktion des Immunkomplextyps wird freies Allergen von IgG- oder IgM-Antikörpern gebunden, wodurch im Serum und in der Lympheflüssigkeit Immunkomplexe entstehen. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe können sich in Organen (z.B. Haut, Niere oder in den Gelenken) ablagern und klinische Symptome wie Urtikaria, Albuminurie oder Arthritis hervorrufen, welche verzögert vier bis sechs Stunden nach Allergenkontakt auftreten und durch eine Komplement-aktivierte Infiltration des Gewebes mit Granulozyten und Makrophagen gekennzeichnet sind (Hahn et al., 2008; S. 101f.). Innerhalb der Typ-III-Reaktionen kann u.a. die generalisierte Serumkrankheit von der lokalisierten Arthus-Reaktion unterschieden werden.

1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Spättyp)

Die Spättypreaktion wird durch allergenspezifische T-Zellen vermittelt. Auslöser sind meist niedermolekulare Antigene, sog. Haptene, die erst nach Bindung an körpereigene Trägerproteine zu „Vollantigenen“ werden und dann eine Immunreaktion hervorrufen können. Im Rahmen der allergischen Reaktion kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Gewebeeinfiltration mit mononukleären Zellen (Monozyten/Makrophagen). Klassischerweise zeigen sich allergische Symptome etwa 48 bis 72 Stunden nach Allergenkontakt. Typische Beispiele stellen die allergische Kontaktdermatitis und Transplantatabstoßungen dar (Hahn et al., 2008; S. 102; Wills-Karp et al., 2001).

1.3 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Allergien rücken immer mehr in den Vordergrund der Gesellschaft und erreichen mittlerweile „endemische“ Ausmaße. Ursprünglich erst in den westlich geprägten Industriestaaten verbreitet, scheinen allergische Erkrankungen in zunehmendem Maße auch in Entwicklungsländern aufzutreten, einhergehend mit den dortigen Veränderungen sozio-ökonomischer Bedingungen (Platts-Mills und Cooper, 2010; van Ree und Yazdanbakhsh, 2007). Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die Hälfte der weltweiten, städtischen Bevölkerung eine atopische Konstitution besitzt, d.h. eine genetische Prädisposition, aufgrund deregulierter Immunmechanismen überschießende Immunreaktionen gegenüber Umweltallergenen zu entwickeln (Holgate und Polosa, 2008).

Die Ätiopathogenese allergischer Erkrankungen ist bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt. Genetische Faktoren sind offensichtlich bei der Entwicklung einer Atopie entscheidend. So liegt das Atopierisiko in Deutschland bei Kindern gesunder Eltern zwischen 5 und 15%, während die Erkrankungshäufigkeit auf 20 bis 40% ansteigt, wenn ein Elternteil Atopiker ist. Sind beide Elternteile Atopiker, steigt das Risiko sogar auf 60 bis 80% (Grevers und Röcken, 2008; S. 4). Interessanterweise ist auch der Zeitpunkt der Allergieentstehung genetisch determiniert. Im Falle zweier atopischer Elternteile kommt es früher zur klinischen Ausprägung der Krankheit als bei Nachkommen nur eines atopischen Elternteils (London et al., 2001). Studien mit mono- und dizygoten Zwillingen bestätigen, dass vererbte Faktoren bei der Entwicklung einer Atopie einen wesentlichen Einfluss haben, da die Konkordanz an einer klinisch manifesten Allergie zu erkranken in eineiigen Zwillingen doppelt so stark ausgeprägt ist wie in zweieiigen Zwillingen (Feijen et al., 2000; Yilmaz-Demirdag et al., 2009). Zudem konnte in Zwillingsstudien gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, an allergischem Asthma bronchiale zu erkranken, zu 50 bis 75% auf genetische Einflüsse zurückzuführen ist (Harris et al., 1997). Allerdings wird die Ausbildung einer Allergie zusätzlich durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren beeinflusst (Abb. 1).

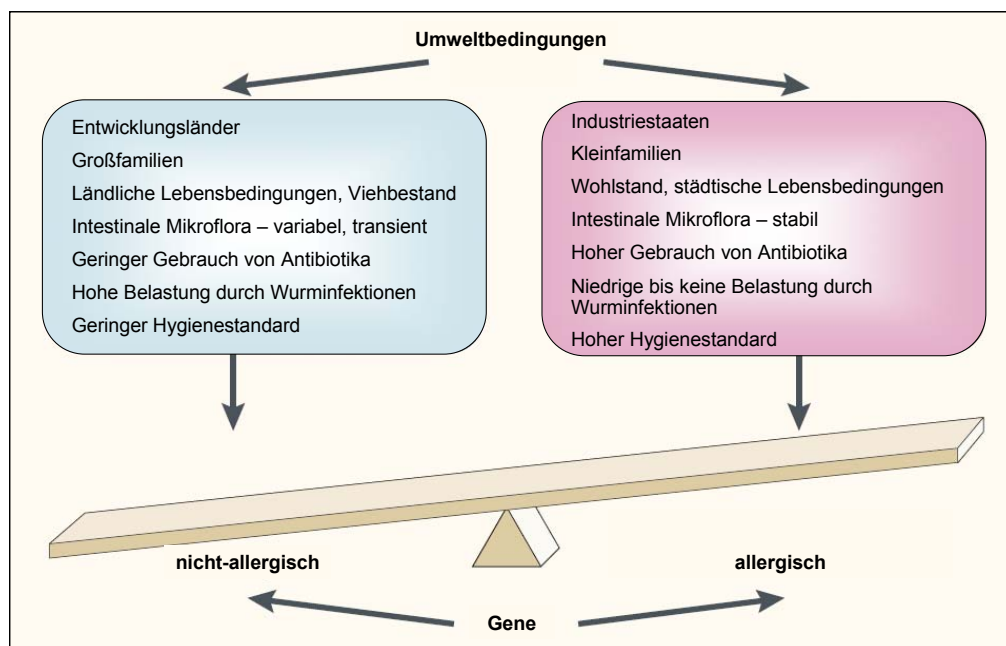


Abb. 1: Einfluss von Umweltfaktoren auf die Prävalenz allergischer Erkrankungen. Ein Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten hauptsächlich in Industriestaaten zu verzeichnen. Da genetische Veränderungen in diesem kurzen Zeitrahmen nahezu ausgeschlossen werden können, sind Unterschiede in den Umweltbedingungen als primäre Ursache für die Zunahme an Allergien anzusehen (modifiziert nach Wills-Karp et al., 2001).

In diesem Zusammenhang sollen z.B. vermehrte Infekte sowie die Exposition mit oro-fäkalen Keimen (z.B. *Helicobacter pylori*, Hepatitis A-Viren) im frühen Kindesalter eine potentiell protektive Wirkung gegenüber der Entwicklung von Allergien aufweisen. Ländliche Lebensbedingungen (Downs et al., 2001; Majkowska-Wojciechowska et al., 2007; Riedler et al.,

2001), der enge Kontakt zu Tieren (Stern et al., 2007), eine hohe Anzahl älterer Geschwister (Karmaus und Botezan, 2002; Strachan, 1989; von Mutius et al., 1994) sowie die Unterbringung in Kindertagesstätten (Ball et al., 2000) werden darüber hinaus als zusätzliche Faktoren angesehen, die der Entstehung einer Allergie entgegenwirken. Diese im Rahmen der sog. „Hygiene-Hypothese“ diskutierten Umwelteinflüsse führen zur Förderung einer protektiven Immunantwort, die als Schlüssel für die Prävention atopischer Krankheiten und möglicherweise auch für deren Ausprägungsgrad angesehen wird (Riedler et al., 2001; Romagnani, 2004).

1.4 Pathophysiologie der Typ-I-Allergie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Immunregulation und Toleranzinduktion der Soforttypallergie. Daher werden die Pathomechanismen dieser allergischen Reaktionsform im Folgenden näher ausgeführt. Eine typische IgE-vermittelte Typ-I-Reaktion stellt bspw. die Rhinokonjunktivitis allergica (RCA) dar. Wurde dieses Krankheitsbild Anfang des 20. Jahrhunderts noch sehr selten diagnostiziert, so stieg seine Prävalenz z.B. in der Schweiz von ca. 0,3% der Bevölkerung im Jahr 1926 auf über 14% im Jahr 1995 an (Wuthrich et al., 1995). Insgesamt nahm die Prävalenz der Typ-I-Allergien in industrialisierten Ländern in den letzten Dekaden stetig zu, so dass mittlerweile über 25% der Bevölkerung in den meisten Industriestaaten an einer Soforttypallergie leiden (Asher et al., 2006; Bousquet et al., 2007; Mothes und Valenta, 2004; Ring et al., 2001). Hervorzuheben ist hierbei der überproportionale Anstieg von Allergien bei Kindern und Jugendlichen (Asher et al., 2006).

Für Typ-I-Allergien ist die Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen apathogene Umweltantigene wie Pollen, Hausstaubmilben, Pilzsporen, tierische Epithelien, Nahrungsmittelallergene sowie Insektengifte oder Arzneimittel charakteristisch. Ein entscheidender Faktor und der initiale Schritt bei der Entwicklung dieses Allergietyps ist die Induktion allergenspezifischer CD4⁺ T-Helfer (Th)-Zellen (Abb. 2). Kommt es zur Aufnahme eines Allergens über die Grenzflächen des Organismus (hierzu zählen die Haut, die Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, der oberen und unteren Atemwege sowie die Konjunktiven), so wird es von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*; APC) wie dendritischen Zellen (DZ), B-Zellen oder Monozyten internalisiert, prozessiert, d.h. in Lysosomen enzymatisch in Peptide gespalten, und anschließend über Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*; MHC) Klasse II-Oberflächenproteine naiven Th0-Zellen präsentiert. Im Rahmen der allergischen Immunantwort kommt es nach Bindung der präsentierten Allergenpeptide durch spezifische T-Zellrezeptoren (*T cell receptor*, TCR) in einem Interleukin (IL)-4-abhängigen Prozess zur Differenzierung der naiven Th0- zu allergenspezifischen Th2-Zellen (Mosmann und Sad, 1996; Romagnani, 1994). Th2-Zellen induzieren durch Sekretion von IL-4 und IL-13 einen Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgE (Del Prete et al., 1988; Punnonen et al., 1993) und damit die Synthese allergenspezifischer IgE-Antikörper durch B-Zellen bzw. Plasmazellen. Anschließend kommt es zur Bindung der allergenspezifischen IgE-Antikörper an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auf der Oberfläche der Effektorzellen der allergischen Entzündung, wie Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten (Sensibilisierungsphase).

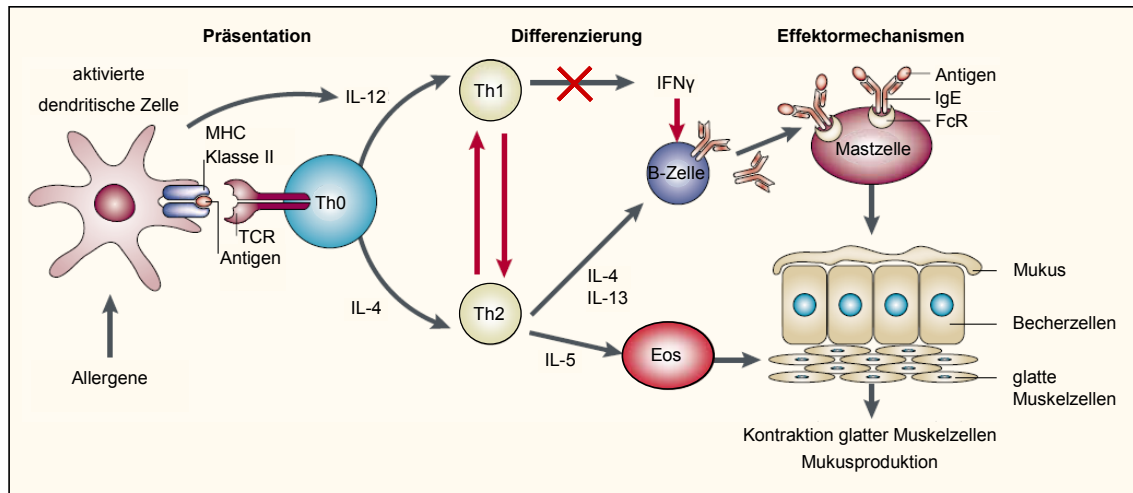


Abb. 2: Regulation und Effektormechanismen der allergischen T-Helfer (Th) 2-Antwort. Die Präsentation allergener Peptide über MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II-Moleküle durch dendritische Zellen führt zu einer Stimulation allergenspezifischer T-Zellen. Im Fall einer allergischen Immunantwort wird Interleukin (IL)-4-vermittelt die Differenzierung $CD4^+$ T-Zellen in Richtung eines Th2-Phänotyps induziert. Th2-Zellen setzen neben IL-4 die Zytokine IL-5 und IL-13 frei. Über den Einfluss bei der initialen Differenzierung hinaus, unterstützt IL-4 als Wachstumsfaktor die Expansion dieser Zellpopulation und reguliert zusammen mit IL-13 die Synthese allergenspezifischer IgE-Antikörper durch B-Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkt IL-12 eine bei gesunden Individuen vorherrschende Th1-gerichtete Immunantwort mit erhöhter Interferon (IFN) γ -Produktion. Die Differenzierung und der Austritt der Eosinophilen (Eos) aus dem Knochenmark in die Peripherie wird durch IL-5 reguliert (modifiziert nach Wills-Karp et al., 2001). FcR, Fc-Rezeptor; TCR, *T cell receptor*.

Bei erneuter Allergenexposition führt die Quervernetzung der auf der Oberfläche der Effektorzellen gebundenen IgE-Antikörper durch das entsprechende Allergen schließlich zur Induktion einer Fc ϵ RI-initiierten Signalkaskade, die in der Degranulation der Effektorzellen und Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie Histamin, Proteasen, Tumornekrosefaktor- α sowie antimikrobieller Peptide mündet (Effektorphase) (Brown et al., 2008; Macfarlane et al., 2000). Zudem beginnen die Mastzellen nach der Quervernetzung allergenspezifischer IgE-Antikörper mit der Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese Entzündungsmediatoren bewirken u.a. die Konstriktion von Venolen, Dilatation der Arteriolen und erhöhen die Permeabilität der Kapillaren. Histamin kann zusätzlich eine Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchien sowie Schleimsekretion bewirken. Neben dem Histamin sind Leukotriene maßgeblich an der allergischen Sofortreaktion beteiligt und aufgrund ihrer hohen bronchokonstriktorischen Aktivität für das Bronchialasthma von besonderer Bedeutung (Hahn et al., 2008; S. 99ff.). Im weiteren Verlauf der allergischen Reaktion wird die Entwicklung inflammatorischer Zellen, wie Eosinophile, Basophile und T-Zellen, sowie deren Rekrutierung an den Ort der Allergenexposition durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen vermittelt, so dass nach sechs bis zwölf Stunden eine weitere „Spätphase“-Reaktion erfolgen kann (Macfarlane et al., 2000; Minai-Fleminger und Levi-Schaffer, 2009; Mosmann und Sad, 1996; Romagnani, 1994; Ying et al., 1997).

Somit umfasst die Definition einer IgE-vermittelten Soforttypreaktion heutzutage die klinisch evidente Reaktion gegenüber ubiquitären Allergenen, welche phänotypisch durch das

Vorhandensein allergenspezifischer IgE-Antikörper einhergehend mit der Rekrutierung und/oder Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen gekennzeichnet ist. Ferner wird T-Lymphozyten, die durch ein Th2-Zell-Zytokinprofil (Produktion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) charakterisiert sind, eine zentrale Rolle bei der Entwicklung allergischer Reaktionen zugesprochen (Wills-Karp et al., 2001).

1.5 Birkenpollenallergie

Pollenallergien oder Pollinosen haben eine beachtliche klinische Bedeutung in Europa mit einer Prävalenz von bis zu 40% (D'Amato et al., 2007). Allergische Erkrankungen werden hauptsächlich durch Pollen von Gräsern, Kräutern und Bäumen verursacht. Zwar ist die Produktion von Pollen ein generelles Merkmal zahlreicher Pflanzen, doch sind lediglich windbestäubte Pflanzen effektive Quellen sog. Aeroallergene. Diese Tatsache wird mit dem in früher Kindheit erforderlichen Allergenkontakt erklärt, der vorrangig über die Mukosa des Respirationstrakts stattfindet (Durham et al., 1997; Niederberger et al., 2002) und für die initiale Sensibilisierung bei der Entwicklung allergischer Erkrankungen einen gewissen Schwellenwert überschreiten muss (Florido et al., 1999).

Unter den pollenproduzierenden Bäumen ist die Birke (*Betula spp.*) eine der bedeutendsten Allergenquellen in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre (Eriksson und Holmen, 1996; Weber, 2003) und somit die Birkenpollenallergie eine der am meisten verbreiteten saisonalen Allergien in Nordeuropa (D'Amato et al., 1998). Abhängig von den Klimabedingungen beginnt die Anthese (Blütezeit) der Birke gewöhnlich Anfang März und endet im Mai (D'Amato et al., 2001). Saisonale Allergien bieten daher eine gute Möglichkeit, die durch kontinuierliche, allergene Belastung über den begrenzten Zeitraum der Pollenflugsaison in Patienten hervorgerufenen Mechanismen einer allergischen Symptomatik im Vergleich zur beschwerdefreien Zeit außerhalb natürlicher Allergenexposition zu untersuchen.

Birkenpollen bestehen aus mehreren Allergenen, von denen das Hauptallergen der Birke, Bet v 1, am besten charakterisiert ist. Bei Bet v 1 handelt es sich um ein aus 159 Aminosäuren bestehendes, 17kDa schweres, zytoplasmatisches Protein mit enzymatischer Aktivität (Bufe et al., 1996). Über 95% der Birkenpollenallergiker weisen Serum-IgE-Antikörper gegen dieses Protein auf (Jarolim et al., 1989; Karamloo et al., 1999; Menz et al., 1996) und mehr als 60% dieser Pollenallergiker reagieren ausschließlich auf Bet v 1. Neben der hohen klinischen Relevanz bei polleninduzierten Allergien (Valenta et al., 1991) spielt Bet v 1 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung des oralen Allergiesyndroms (Anhoj et al., 2001). So reagieren Birkenpollenallergiker auch häufig auf Majorallergene von Äpfeln, Birnen, Kirschen und Aprikosen, die alle strukturelle Übereinstimmungen mit Bet v 1 aufweisen (Rodriguez et al., 2000; Vieths et al., 2002).

1.6 Humorale Immunantwort der Soforttypallergie

Die Mechanismen, die an der Kaskade allergischer Entzündungsreaktionen beteiligt sind, umfassen eine Vielzahl von Mediatoren und Zelltypen. Zu diesen gehören auch die Antikörper als Vermittler der erworbenen humoralen Immunantwort. Es gibt fünf verschiedene humane

Antikörperklassen: IgE, IgG, IgA, IgM und IgD, wobei die drei erstgenannten Klassen als wesentliche Komponenten im Rahmen allergischer Typ-I-Reaktionen diskutiert werden.

1.6.1 IgE

Wie im Rahmen der für die Typ-I-Allergie relevanten Pathomechanismen beschrieben, ist ein charakteristisches Merkmal allergischer Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp das Vorhandensein von IgE-FcεRI-Komplexen auf Effektorzellen und die nach Allergenkontakt durch FcεRI-Quervernetzung vermittelte Degranulation mit Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (vgl. Kap. 1.4). Vor mehr als 40 Jahren wurden IgE-Antikörper, damals noch als Reagine bezeichnet, als die Schlüsselmoleküle der allergischen Soforttypreaktion beschrieben (Ishizaka et al., 1966a; Ishizaka et al., 1966b; Johansson und Bennich, 1967). Die Konzentration an frei zirkulierendem IgE ist im Verhältnis zu den anderen Antikörperklassen im Blutkreislauf stark unterrepräsentiert. Im Vergleich zu IgG-Antikörpern liegt IgE im Serum gesunder Personen in einer 10^4 -fach niedrigeren Konzentration vor (Gould und Sutton, 2008), allerdings ist bei Atopikern eine starke Zunahme der IgE-Konzentrationen zu verzeichnen. Die biologische Aktivität von IgE ist dennoch sehr hoch, da IgE-Antikörper, wie erwähnt, an Hochaffinitätsrezeptoren auf der Effektorzelloberfläche binden und somit der größte Teil des IgE in zellgebundener Form vorliegt. Zudem ist IgE in der Lage, die Expression von FcεRI und dem niedrig-affinen FcεRII (CD23) selbst zu regulieren (Kisselgof und Oettgen, 1998; Yamaguchi et al., 1997). Dieser positive Rückkopplungsmechanismus ermöglicht es, bei zunehmenden IgE-Konzentrationen die Dichte an Rezeptoren auf Effektorzellen zu erhöhen und damit sowohl die Sensibilisierung als auch die Degranulation nach Allergenkontakt zu potenzieren. Trotz einer sehr kurzen Halbwertszeit von IgE wird ein Fortbestehen der IgE-vermittelten allergischen Antwort durch die Langlebigkeit IgE-produzierender B-Zellen sowie durch die Mastzellpersistenz in der Haut gewährleistet (Platts-Mills, 2001).

1.6.2 IgG

Mit einem Anteil von ungefähr 75% an der Gesamtmenge aller Antikörper ist IgG quantitativ das immunologisch relevanteste Immunoglobulin. Auch hinsichtlich der Immunantwort gegen Allergene sind IgG-Antikörper ein wichtiger Faktor. Antikörper dieser Klasse können sowohl zu einer Blockade der Allergenbindung an FcεRI als auch an FcεRII führen (Pilette et al., 2007; van Neerven et al., 1999) und auf diese Weise eine allergeninduzierte Entzündungsreaktion unterbinden. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass IgG-Antikörper eine IgE-vermittelte Anaphylaxie *in vivo* blockieren können (Strait et al., 2006). Außerdem wurde beschrieben, dass IgG-Antikörper in der Lage sind, die allergeninduzierte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Basophile und Mastzellen zu hemmen, die Aktivierung von T-Zellen durch Inhibition der IgE-medierten Allergenpräsentation zu verhindern (van Neerven et al., 1999) sowie in Monozyten und Makrophagen die Sekretion von IL-10 zu induzieren (Sutterwala et al., 1998). Humane IgG-Antikörper können aufgrund struktureller Unterschiede in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilt werden, wobei vor allem dem IgG4-Isotyp im Rahmen

allergischer Erkrankungen aufgrund seiner protektiven Eigenschaften eine bedeutsame Rolle zugesprochen wird.

IgG4 ist ein neutralisierender IgG-Isotyp mit einer schwachen Kapazität, Komplement und Zellen zu aktivieren. Diese Eigenschaften beruhen auf der niedrigen Affinität zu C1q, dem q-Fragment des ersten Komplement-Bestandteils, und zu Fcγ-Rezeptoren (van der Zee et al., 1986). Aus dem Blut isolierte IgG4-Antikörper besitzen antiinflammatorische Eigenschaften, da sie nicht in der Lage sind, identische Antigene zu vernetzen und größere Immunkomplexe zu bilden (Aalberse und Schuurman, 2002; Schuurman et al., 1999). Zudem fungiert die IgG4-Subklasse als blockierender Antikörper und ist ein wesentlicher Faktor bei der Abschwächung allergischer Antworten (Akdis et al., 2005). Es konnte mittlerweile experimentell nachgewiesen werden, dass die Induktion von IgG4-Antikörpern ein die Immunantwort modulierender Prozess ist, welcher durch die Interaktion mit regulatorisch wirksamen T-Zellpopulationen hervorgerufen wird (s.u.) (Meiler et al., 2008a; Satoguina et al., 2008).

1.6.3 IgA

In Mausstudien wurde früh beobachtet, dass die Produktion von IgA-Antikörpern in Verbindung mit oraler Toleranz steht (Challacombe und Tomasi, 1980). Allgemein ist IgA der vorherrschende Isotyp in mukosalen Geweben bzw. Sekreten und stellt damit den primären Abwehrmechanismus bei der Neutralisierung von Antigenen dar, die über den Respirations- oder Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden. Im Zusammenhang atopischer Erkrankungen wurden verminderte Konzentrationen an allergenspezifischen IgA-Antikörpern im Serum allergischer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert (Bahceciler et al., 2005). Analog zu IgG4 werden IgA-Antikörpern antiinflammatorische Eigenschaften zugeordnet, da diese einerseits in der Lage sind, die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen zu inhibieren und zum anderen nur eine geringe Kapazität besitzen, Komplement zu aktivieren (Wolf et al., 1994). Interessanterweise werden IgA-Antikörper auch mit der Sekretion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 durch Monozyten in Verbindung gebracht. Periphere Monozyten, die mit IgA-Antikörpern aus dem Serum von Patienten unter spezifischer Immuntherapie (SIT) inkubiert wurden, wiesen nach allergenvermittelter Quervernetzung der Rezeptoren eine erhöhte IL-10-Produktion auf (Pilette et al., 2007). Dagegen spielen IgA-Antikörper als direkter supprimierender Faktor keine Rolle, da durch Zugabe spezifischer IgA-Antikörper weder die IgE-vermittelte Allergenpräsentation durch B-Zellen (Pilette et al., 2007; van Neerven et al., 1999), noch die Degranulation von Basophilen verhindert werden konnte (Lichtenstein et al., 1968). Im Menschen kann zudem eine weitere Differenzierung von IgA-Antikörpern in die Subklassen IgA1 und IgA2 vorgenommen werden.

1.7 T-Lymphozyten im Kontext allergischer Typ-I-Reaktionen

Die zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort auf zellulärer Ebene spielen T-Lymphozyten. Die Effektorfunktionen dieser Zellpopulation sind hauptsächlich für die zelluläre Immunität verantwortlich, wobei vielfältige Interaktionen mit B-Lymphozyten keine absolute Trennung zur humoralen Antwort zulassen. Aufgrund charakteristischer Merkmale können im humanen

Immunsystem mehrere T-Zellpopulationen, die am Pathomechanismus der Soforttypallergie beteiligt sind, voneinander unterschieden werden.

1.7.1 T-Helfer-Zellen und assoziierte Zytokine in der Pathogenese der allergischen Soforttypreaktion

Ein entscheidender Faktor bei der Immunantwort gegenüber Allergenen ist die funktionelle Diversität der $CD4^+$ Th-Zellen. Nach Bindung eines Peptid-MHC-Komplexes an den entsprechenden TCR führt die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in Abhängigkeit von der Art der Immunantwort zur Entwicklung von zwei funktionell unterschiedlichen Th-Zellpopulationen. Die Unterscheidung der Populationen in Th-Zellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) oder Typ 2 (Th2-Zellen) erfolgte zunächst in Mäusen (Mosmann und Coffman, 1989). Aufgrund der unterschiedlichen Zytokinsekretionsmuster und den damit verbundenen Effektorfunktionen konnte die Dichotomie der Th-Zellen später auch im Menschen nachgewiesen werden (Romagnani, 1994) (Abb. 3).

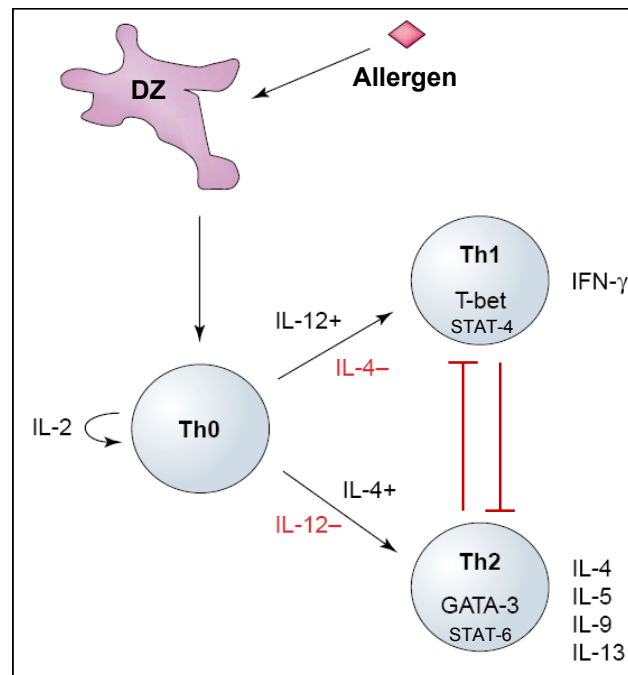


Abb. 3: Die dichotome T-Helfer (Th)-Differenzierung nach Allergenexposition. Nach Allergenpräsentation durch dendritische Zellen (DZ) und Peptiderkennung durch naive T (Th0)-Zellen kommt es in Gegenwart von Interleukin (IL)-12 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-4 (*signal transducer and activator of transcription-4*) und T-bet (*T-box expressed in T cells*), die eine Polarisierung in Richtung Th1-Zellen fördern. Im Gegensatz dazu begünstigt die Produktion von IL-4 die Aktivierung von STAT-6 und GATA-3 (GATA-bindendes Protein 3) und damit eine Th2-Zellgerichtete Differenzierung (modifiziert nach Jarnicki und Fallon, 2003).

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass DZ und Makrophagen nach Stimulation durch bakterielle Komponenten IL-12 produzieren und damit die Th1-Entwicklung fördern (Hsieh et al., 1993). Ein Kontakt mit Helminthen, Allergenen oder löslichen Proteinen bewirkt dagegen eine IL-4-Sekretion, wodurch bevorzugt die Differenzierung von Th2-Zellen stattfindet. Die für die Produktion von IL-4 verantwortliche Quelle in dieser frühen Phase der Immunantwort ist noch

nicht abschließend identifiziert. Es konnte jedoch unlängst in einem *in vivo* Mausmodell gezeigt werden, dass Basophile durch die Proteaseaktivität von Allergenen direkt aktiviert werden konnten und daraufhin Th2-Zell-induzierende Zytokine einschließlich IL-4 produzierten (Sokol et al., 2008). Neben den unterschiedlichen funktionellen Phänotypen zeichnen sich Th1- und Th2-Zellen dadurch aus, dass sie reziprok die Bildung sowie die Aktivierung des anderen Th-Zelltyps inhibieren (Abbas et al., 1996).

1.7.1.1 T-Helfer 2-Zellen und assoziierte Zytokine

IgE-vermittelte, allergische Erkrankungen werden durch eine anomale Immunantwort gegenüber Allergenen verursacht. Wie im Kap. 1.4 beschrieben, spielen dabei Th2-Zellen und die mit ihnen assoziierten Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Allergene verstärkt Th2-Antworten in Atopikern hervorrufen (Parronchi et al., 1991) und sich Th2-Zellen in den Effektororganen dieser Patienten anreichern (Del Prete et al., 1993; Hamid et al., 1991). Die durch Th2-Zellen sezernierten Zytokine üben ihre Wirkung auf vielfältige Art und Weise aus, z.B. bei der Inhibition der Makrophagenaktivierung, der Entwicklung der IgE-Antikörperantwort sowie bei dem Auslösen einer Eosinophilie. Eine Schlüsselrolle bei der Th2-Zelldifferenzierung nehmen die Transkriptionsfaktoren STAT-6 (*signal transducer and activator of transcription-6*) sowie GATA-3 (GATA-bindendes Protein 3) ein (Zheng und Flavell, 1997). So konnte auf transkriptioneller Ebene zum einen gezeigt werden, dass das Fehlen von STAT-6 die T-Zellentwicklung in Richtung Th2-Zellen beeinträchtigt (Kaplan et al., 1996), andererseits GATA-3 die Produktion von IFN γ inhibiert sowie die Expression von IL-5 und IL-13 reguliert (Romagnani, 2004; Zhu et al., 2006). Interessanterweise scheint GATA-3 auch die Entwicklung einer Allergentoleranz inhibieren zu können, indem es direkt an den Promotor des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*forkhead winged-helix transcriptional factor Box p3*) bindet, welcher als essentiell für die Entwicklung und regulatorische Funktion bestimmter T-Zellpopulationen angesehen wird (Mantel et al., 2007) (vgl. Kap. 1.7.2).

Eine bedeutende Funktion des Zytokins IL-4 liegt in der IL-4-abhängigen Differenzierung naiver Th0- zu allergieassoziierten Th2-Zellen und in der Aufrechterhaltung des Th2-Zellphänotyps begründet. Anfänglich als Wachstumsfaktor für B-Zellen beschrieben, haben Studien mit IL-4-defizienten Mäusen gezeigt, dass IL-4 für die initiale Generierung einer Th2-Zellantwort und der damit einhergehenden allergischen Entzündungsreaktion von essentieller Bedeutung ist (Brusselle et al., 1994). Darüber hinaus wird die Entwicklung der Vorläufer-Th-Zellen in Richtung Th2-Zellen beeinflusst, indem die Interaktion von IL-4 mit dem auf naiven Th-Zellen oberflächengebundenen IL-4-Rezeptor (IL-4R) zur Aktivierung von STAT-6 führt. Nach dem Erkennen eines Allergens durch B-Zellen, liefert IL-4 und/oder IL-13 das notwendige Signal für einen Isotypenwechsel der B-Zellen, der mit der Synthese und Sekretion allergenspezifischer IgE- und IgG4-Antikörper einhergeht (Broide, 2001; Del Prete et al., 1988; Punnonen et al., 1993). Zusätzlich fördert IL-4 die Differenzierung von Monozyten und Mastzellen, die Mastzellrekrutierung sowie die Reifung von Basophilen und ist in der Lage, die Th1-Zellentwicklung und damit einhergehend die IFN γ -Produktion zu inhibieren. Die Expression der

IL-12R- β 2-Kette wird durch IL-4 verhindert und damit eine Voraussetzung für die Differenzierung der Th1-Zellen unterbunden (Szabo et al., 1997).

IL-5 ist entscheidend an der Entwicklung der Th2-Zell-vermittelten allergischen Reaktion beteiligt. So ist IL-5 ein zentraler Faktor bei der Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten (Jarnicki und Fallon, 2003; Sanderson, 1992). Zudem stimuliert IL-5 nicht nur die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Eosinophilen im Knochenmark (Clutterbuck et al., 1989), sondern fördert auch die Freisetzung der Eosinophilen aus dem Knochenmark (Palframan et al., 1998). Zusammen mit der allergeninduzierten Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI führt IL-5 außerdem zur raschen Degranulation von Eosinophilen, deren granuläre Inhaltsstoffe bei allergischen Reaktionen zu Gewebeschädigungen führen können.

IL-9 ist an der Rekrutierung, Differenzierung und Proliferation von Mastzellen und Eosinophilen beteiligt. In transgenen Mäusen führte die Überexpression von IL-9 zu einer gesteigerten Hyperreagibilität der Atemwege, erhöhter Eosinophilie und einem Anstieg der IgE-Antikörperkonzentrationen nach Antigenstimulus (McLane et al., 1998). Darüber hinaus scheint eine erhöhte IL-9-Produktion in Atopikern eher mit der Manifestation asthmatischer Beschwerden als mit einer allergischen Rhinitis einherzugehen (Devos et al., 2006).

IL-13 besitzt eine Vielzahl verschiedener Eigenschaften innerhalb der allergischen Immunantwort. So ist IL-13 u.a. an der Regulation der IgE-Produktion, der eosinophilen Entzündungsreaktion, der Hyperreaktivität der Atemwege und der Rekrutierung von Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und T-Zellen beteiligt (Wynn, 2003). IL-13 spielt auch eine Rolle bei der Induktion der Becherzellhyperplasie mit gesteigerter Mukusproduktion als Zeichen einer chronischen Epithelreizung, z.B. bei Asthma bronchiale (Zhu et al., 1999).

1.7.1.2 T-Helfer 1-Zellen und assoziierte Zytokine

Die Th1-Zellpopulation ist gekennzeichnet durch die Produktion des Markerzytokins IFN γ , welches eine entscheidende Rolle bei der Makrophagenaktivierung, Phagozytenantwort und bei der Entwicklung zellvermittelter Immunität spielt. Th1-Zellen werden vorwiegend mit Überempfindlichkeitsreaktionen des Spättyps, Autoimmunkrankheiten und Transplantatabstoßung in Verbindung gebracht (Romagnani, 2006). Für die Entwicklung der Th1-Zellen ist IL-12 von essentieller Bedeutung. Der IL-4/IL-4R-Interaktion bei der Induktion von Th2-Zellen entsprechend führt die Wechselwirkung von IL-12 mit IL-12R auf der Oberfläche naiver Th-Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-4, der in Kooperation mit T-bet (*T-box expressed in T cells*) an einer Th1-Zell-gerichteten Differenzierung beteiligt ist (Romagnani, 2004; Szabo et al., 2000; Thieu et al., 2008). Im Gegenzug verhindert T-bet die Th2-Zelldifferenzierung auf transkriptioneller Ebene durch Repression des IL-4-Gens (Djuretic et al., 2007) sowie GATA-3 (Usui et al., 2006). In Atopikern konnte diesbezüglich eine gestörte Expression von T-bet im Gegensatz zu gesunden Kontrollen festgestellt werden (Finotto et al., 2002).

IFN γ beeinflusst die Entwicklung naiver Th-Zellen in Richtung eines Th1-Zellphänotyps auf indirekte Weise über eine gesteigerte Expression der IL-12R- β 2-Kette (Mullen et al., 2001) und über die erhöhte IL-12-Produktion durch APC, wie Monozyten, DZ und Makrophagen (Snijders

et al., 1998; Szabo et al., 2003). Darüber hinaus vermindert IFN γ Th2-Zell-vermittelte allergische Entzündungsreaktionen, indem es einerseits direkt die IL-4-Genexpression (Elser et al., 2002) und damit auch die IL-4-induzierte IgE-Synthese supprimiert, andererseits durch Induktion der Stickstoffmonoxid-Produktion die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation verhindert (Eastmond et al., 1997). Während der IgE-Isotypwechsel inhibiert wird, fördert IFN γ die Produktion von IgG-Antikörpern und induziert Apoptose in T-Zellen und Eosinophilen (Luttmann et al., 2000; Refaeli et al., 2002).

Das Zytokin IL-12 ist der entscheidende Gegenspieler hinsichtlich der Funktion von IL-4 bei der Entwicklung von Th2-Zellen, indem es die Polarisierung naiver Vorläufer-T-Zellen zu Th1-Zellen fördert (Gately et al., 1998). Da IL-12 die Transkription von IFN γ in T- und NK-Zellen induziert, ist es zudem ein wichtiger Regulator der zellvermittelten Immunantwort.

1.7.1.3 Weitere T-Helfer-Zellpopulationen

Die Klassifikation der Th-Zellen beruhte lange Zeit lediglich auf einer dichotomen Einteilung von Th2- und Th1-Zellen. Neuere Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass die Vielfalt der Th-Zellen nicht mehr auf diese beiden Th-Populationen beschränkt ist, sondern dass ein viel komplexeres System an Th-Effektorzellen besteht. Die Rolle, die Zellpopulationen wie Th9- (Soroosh und Doherty, 2009) und Th17-Zellen (Oboki et al., 2008; Schmidt-Weber et al., 2007) bei der Ausbildung allergischer Erkrankungen einnehmen könnten, ist momentan noch weitestgehend ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen. Eine weitere Untergruppe der Th-Zellen, die sog. Th22-Zellen, scheinen dagegen an pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen chronisch inflammatorischer Hauterkrankungen beteiligt zu sein (Duhon et al., 2009; Eyerich et al., 2009).

1.7.1.4 T-Helfer 2/T-Helfer 1-Modell

Lange Zeit wurde ein gestörtes Gleichgewicht zwischen allergenspezifischen Th2- und Th1-Zellen zugunsten des Th2-Phänotyps als primäre Ursache für das Auftreten allergischer Inhalationskrankheiten angesehen (Romagnani, 2006). Eine Th1-dominierte Immunantwort wurde eher in den Kontext der Entstehung allergischer Spättypreaktionen oder von Autoimmunkrankheiten gestellt. Bei atopischen Patienten fiel eine Verschiebung des Th2/Th1-Quotienten in Richtung allergieassoziiierter Th2-Zellen auf. So wurde in prospektiven Studien gezeigt, dass Individuen, die im Säuglingsalter ein von Th2-Zellen geprägtes Zytokinprofil aufwiesen, im Verlauf ihres Lebens mit höherer Wahrscheinlichkeit eine allergische Erkrankung entwickelten. Ebenfalls ließen sich durch saisonale Allergenexposition verursachte Anstiege des Verhältnisses IL-4-produzierender Th2-Zellen zu IFN γ ⁺ Th1-Zellen bei Allergikern nachweisen (Gabrielsson et al., 1997; Imada et al., 1995). Die Veränderungen im Verhältnis von Th2- zu Th1-Zellen gingen dabei einerseits auf den Anstieg der IL-4-produzierender T-Zellen zurück, wobei die Sekretion von IFN γ im gleichen Zeitraum unverändert blieb (Lagier et al., 1995), andererseits wurde ein gestörtes Gleichgewicht aufgrund beeinträchtigter IFN γ -Produktion nach Allergenexposition beobachtet (Leonard et al., 1997; Renzi et al., 1999).

1.7.2 Regulatorische T-Zellen

Die Pathogenese von Allergien sowie Autoimmunkrankheiten wurde wie beschrieben eine geraume Zeit ausschließlich im Zusammenhang der Fehlregulation von Th1- und Th2-Zellen und dem dadurch zwischen diesen Zellpopulationen entstandenen Ungleichgewicht gesehen. Neuere Untersuchungen weisen indessen auf die bedeutsame Rolle einer weiteren Population von T-Zellen hin, die immunregulatorische Aktivität besitzen und eine Schlüsselfunktion bei der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung immunologischer Toleranz einzunehmen scheinen und daher als regulatorische T (Treg)-Zellen bezeichnet werden. So wurden im Verlauf der Jahre die Hinweise immer stärker, dass die periphere Regulation der T-Zellen ein entscheidender Faktor bei der Kontrolle gesundheitsschädlicher T-Zellantworten zu sein scheint. Obwohl schon seit den frühen 1970ern eine Vielzahl verschiedener Suppressormechanismen beschrieben worden war, wurde die Biologie der Treg-Zellen erst in den letzten beiden Dekaden wieder vermehrt Objekt intensiver Forschung.

Treg-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase, da sie die Eigenschaft besitzen, die Funktion von Effektor-T (Teff)-Zellen zu supprimieren und damit die Immunantwort einzuschränken. Zudem entwickeln sie inhibitorische Aktivität gegenüber APC wie Makrophagen und DZ. Eine Veränderung in der Anzahl und in der suppressiven Funktion von Treg-Zellen wurde sowohl bei allergischen Krankheitsbildern als auch bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, wie multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Typ-1-Diabetes beschrieben (Torgerson, 2006). Zusätzlich wurde eine große Anzahl an Treg-Zellen in malignen Tumoren einschließlich Lungen-, Pankreas- und Brustkrebs gefunden. Dies führte zu der Hypothese, dass die Einschränkung der immunsuppressiven Kapazität von Treg-Zellen zur Ausbildung von Allergien und Autoimmunkrankheiten beitragen kann, während ihre natürliche Aktivität bei Tumorerkrankungen eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort verhindert (Cools et al., 2007). Da Treg-Zellen die Proliferation allergenspezifischer Th-Zellen sowie die Sekretion Th2- und Th1-assoziiierter Zytokine beeinflussen, werden diese Zellen als ein entscheidender Faktor bei der Immunantwort gegenüber Allergenen angesehen (Bellinghausen et al., 2003). Zwar finden sich Treg-Zellen sowohl in gesunden Probanden als auch bei Allergikern, allerdings scheint ihre supprimierende Funktion bei allergischen im Gegensatz zu nicht-allergischen Individuen vermindert zu sein. So zeigte sich bei Atopikern eine geringere supprimierende Kapazität der Treg-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Bellinghausen et al., 2005; Ling et al., 2004). Auch lässt sich bei Birkenpollenallergikern eine eingeschränkte Suppression der Proliferation von Teff-Zellen nach Stimulation mit Birkenpollenallergen (BPA) beobachten, während Treg-Zellen gesunder Probanden die Teff-Zellproliferation unterbinden können (Thunberg et al., 2007). Hinsichtlich der Betrachtung von Treg-Zellen müssen jedoch verschiedene Populationen voneinander abgegrenzt werden, da diesen im Rahmen der Immunmodulation vermutlich unterschiedliche Funktionen zukommen.

1.7.2.1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

Der Großteil der Treg-Zellen besteht aus CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv den Aktivierungsmarker CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) exprimieren. Die Population der CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen ist zudem durch die Expression von Foxp3 charakterisiert und umfasst zwischen 5 bis 10% aller CD4⁺ Zellen (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Die Expression von Foxp3 spielt bei einer Reihe von Immunprozessen eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Foxp3 spontane Autoimmunantworten mit Multiorganentzündung und früher Letalität begünstigt (Bennett et al., 2001; Chatila et al., 2000), aber auch mit einer erhöhten Atopieneigung einhergehen kann (Lin et al., 2005).

Neben Foxp3 ist diese Art der Treg-Zellen zusätzlich durch die erhöhte Expression der beiden Marker GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) und CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) charakterisiert (Fontenot et al., 2003; Nocentini und Riccardi, 2005; Shevach und Stephens, 2006). CTLA-4 ist in den regulatorischen Signalweg des Tryptophan-Katabolismus involviert (Grohmann et al., 2002), der als einer der möglichen kontaktabhängigen Effektormechanismen der Treg-Zellen angesehen wird (Mellor und Munn, 2004). Dieser Signalweg wird durch die Interaktion von GITR und GITR-Ligand (GITRL) moduliert (Grohmann et al., 2007). Das GITR-GITRL Ko-Rezeptorsystem kann die suppressive Kapazität von Treg-Zellen aufheben und Teff-Zellen ko-stimulieren (Ko et al., 2005; Kohm et al., 2004; Shimizu et al., 2002; Stephens et al., 2004).

Weiterhin kennzeichnet sich diese Treg-Population durch die Eigenschaft, ihre supprimierende Kapazität auf andere CD4⁺ T-Zellen übertragen zu können (Modigliani et al., 1996; Qin et al., 1993). Dieses als „infektiöse Toleranz“ bezeichnete Phänomen scheint von der Sekretion der Zytokine IL-10 (Dieckmann et al., 2002) und TGF- β (*transforming growth factor- β*) abhängig zu sein (Jonuleit et al., 2002) und beschreibt, dass adoptiv transferierte Treg-Zellen nicht nur Toleranz induzieren, sondern im Rezipienten auch direkt die Konvertierung naiver alloreaktiver T-Zellen zu Treg-Zellen vermitteln können.

Neben den sog. natürlichen (n)Treg-Zellen, die sich im Thymus entwickeln und dann in die peripheren lymphatischen Organe auswandern (Shevach et al., 2006), gibt es eine weitere CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Population, die sich phänotypisch nicht von der Erstgenannten unterscheiden lässt. Im Gegensatz zu nTreg-Zellen entsteht dieser als „adaptive“ Foxp3⁺ Treg-Zellen bezeichnete Subtyp erst in der Peripherie (Apostolou und von Boehmer, 2004; Cobbold et al., 2004; Curotto de Lafaille et al., 2004; Mucida et al., 2005). Zu erwähnen ist, dass in der Literatur die Bezeichnung „adaptiv“ ursprünglich für antigenspezifische, induzierbare Foxp3⁺ Treg-Zellen wie die Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen (s.u.) verwandt wurde (Levings et al., 2005; Vieira et al., 2004). Inzwischen wird dieser Terminus jedoch gezielt für die durch Antigenstimulation in der Peripherie induzierten Foxp3⁺ Treg-Zellen beansprucht, um darauf hinzuweisen, dass diese Zellen aus naiven Foxp3⁻ T-Zellen entstehen, die nicht im Thymus als Foxp3⁺ nTreg-Zellen selektiert wurden (Curotto de Lafaille et al., 2008) (vgl. Abb. 4). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen auch *in vitro* durch Antigenstimulation in Gegenwart von IL-2 und TGF- β in Foxp3⁺ Treg-Zellen umgewandelt werden können (Mothes et al., 2003; Zheng und Flavell, 1997).

Ein weiteres wesentliches Unterscheidungsmerkmal ist das Zytokinmuster der Treg-Zellen, insbesondere die Sekretion der von IL-10 und TGF- β , da durch diese Zytokine sowohl Immunantworten unmittelbar beeinflusst als auch die Treg-Zellen in autokriner Weise reguliert werden können (Bacchetta et al., 2002; Roncarolo et al., 2006; Wilczynski et al., 2008). *In vitro* sind die supprimierenden Eigenschaften der Treg-Zellen kontaktabhängig. Dagegen konnte in *in vivo* Modellen eine Suppression durch Treg-Zellen beobachtet werden, die IL-10-abhängig war. Es stellt sich daher die Frage, ob IL-10 lediglich für die Bildung dieser Treg-Population, aber nicht zwingend für ihre supprimierende Aktivität benötigt wird (Wills-Karp et al., 2001). Auf Grundlage der Zytokinsekretion konnten neben den $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ noch weitere Formen von Treg-Zellen abgegrenzt werden, die an der Aufrechterhaltung des komplexen Gleichgewichts der Immunhomöostase beteiligt sind (Groux et al., 1997) und durch antigenspezifische Stimulation aktiviert werden (Doetze et al., 2000; Jonuleit et al., 2002; Jonuleit et al., 2000). Diese Treg-Populationen umfassen die antigenspezifischen, $Foxp3^+$ Tr1- und Th3-Zellen, die ihre regulatorische Kapazität ausschließlich über die Sekretion supprimierender Zytokine erreichen.

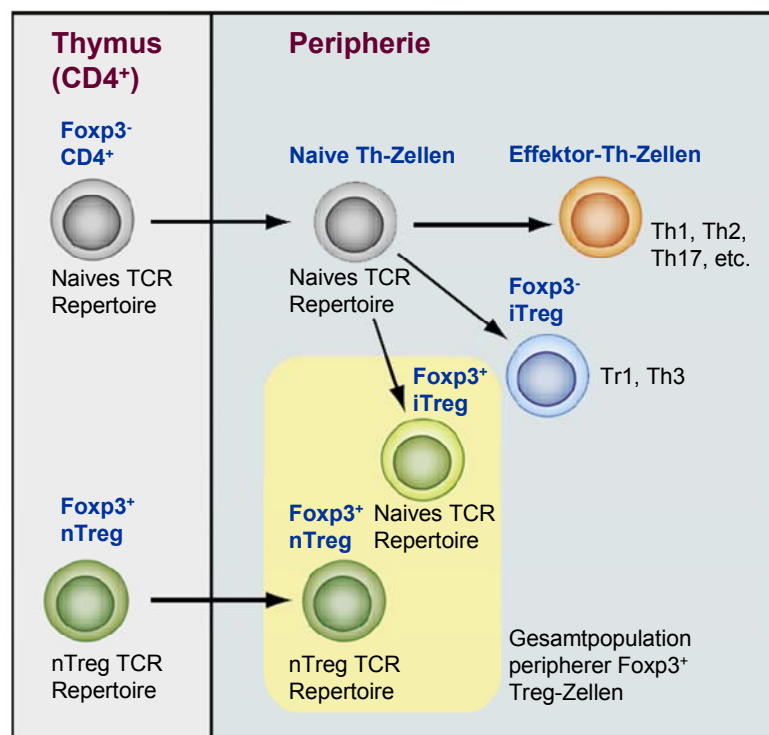


Abb. 4: Differenzierung $CD4^+$ regulatorischer T-Zellen im Thymus und in der Peripherie. Im Gegensatz zu natürlichen regulatorischen T (nTreg)- Zellen, die im Thymus differenzieren und anschließend in peripheres Gewebe auswandern, findet die Differenzierung induzierbarer $Foxp3^+$ Treg-Zellen (iTreg) in sekundären lymphatischen Organen und Geweben statt. In der Peripherie sind somit Thymus-abgeleitete $Foxp3^+$ nTreg- von adaptiven iTreg-Zellen phänotypisch nicht mehr zu differenzieren. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass sich beide $Foxp3^+$ Treg-Zellpopulationen in ihrem TCR (*T cell receptor*)-Repertoire unterscheiden, da iTreg-Zellen das TCR-Repertoire naiver $CD4^+$ Zellen aufweisen (modifiziert nach Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009).

1.7.2.2 Typ-1-regulatorische T-Zellen

Bei Tr1-Zellen handelt es sich um eine Population regulatorischer $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen, die vor allem durch die ungewöhnlich hohe Produktion des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 gekennzeichnet ist (Groux et al., 1997; Roncarolo et al., 2006). Da auch $Foxp3^+$ Treg-Zellen teilweise vermehrt IL-10 produzieren, wurde im Zusammenhang mit der Entstehung dieser Treg-Population postuliert, dass die aus dem Thymus stammenden nTreg-Zellen nach Antigenexposition terminal zu Tr1-Zellen differenzieren könnten. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass es sich bei nTreg- und Tr1-Zellen um zwei unterschiedliche Populationen mit ähnlichen regulatorischen Eigenschaften handelt (Bacchetta et al., 2002).

Das Markerzytokin der Tr1-Zellen, IL-10, hat eine Vielzahl immunologisch wichtiger, immunsupprimierender Eigenschaften. Von IL-10 ist bekannt, dass es die Expression einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Enzymen inhibiert, die Proliferation peripherer T-Zellen nach Antigenstimulation hemmt und eine entscheidende, immunregulatorische Rolle bei der Entstehung der T-Zellanergie spielt (Akdis et al., 1998; Akdis et al., 2001; Akdis et al., 2000). Zusätzlich moduliert IL-10 die Funktion von Eosinophilen (Schandene et al., 1994) und reduziert die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren aus Mastzellen (Marshall et al., 1993). *In vitro* Daten haben zudem gezeigt, dass IL-10 die Produktion von Antikörpern des IgG4-Isotyps erhöhen kann, indem es den IL-4-medierten Klassenwechsel zu IgE verhindert (Jeannin et al., 1998). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass IL-10 seine immunsupprimierende Aktivität sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene ausübt. Die klinische Bedeutung von IL-10 bei der Suppression allergischer Immunreaktionen konnte bspw. bei Patienten mit allergischem Asthma aufgezeigt werden, da in der bronchoalveolaren Lavage und nach Stimulation peripherer Blutzellen eine deutlich verringerte IL-10-Produktion im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert wurde (Borish et al., 1996).

1.7.2.3 T-Helfer 3-Zellen

Eine weitere Subpopulation an $Foxp3^-$ Treg-Zellen wird als Th3-Zellen bezeichnet. Diese Zellen lassen sich aufgrund einer erhöhten Sekretion an TGF- β zu einer eigenen Gruppe induzierbarer Treg-Zellen zusammenfassen (Faria und Weiner, 2005). Th3-Zellen wurden erstmals im Zusammenhang mit der Induktion oraler Toleranz beschrieben (Chen et al., 1994; Weiner et al., 1994). Aktuell wird diskutiert, ob Th3-Zellen entweder gemeinsam mit Tr1-Zellen einer Gruppe adaptiver Treg-Zellen angehören (Akdis et al., 2004) oder ob es sich bei dieser Population letztendlich um aktivierte $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen handeln könnte (Wu et al., 2007).

Neben den erwähnten Treg-Klassen gibt es noch eine Reihe weiterer Treg-Zellpopulationen (Ozdemir et al., 2009), wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen hinsichtlich ihrer Spezifikation und Wirkung momentan keine abschließende Klassifikation erlauben.

1.8 Therapieformen bei allergischer Erkrankung

Gegenwärtig existieren zahlreiche Behandlungsansätze zur Therapie der IgE-vermittelten Soforttypallergie, die hauptsächlich einen experimentellen Charakter aufweisen oder lediglich

symptomorientiert sind. Als einziges kausales Behandlungsverfahren für allergische Krankheiten hat sich bislang lediglich die SIT durchgesetzt (Abb. 5).

1.8.1 Symptomatische Behandlungsformen

Die symptomatischen Therapien konzentrieren sich neben der Expositionsprophylaxe darauf, medikamentös die bei einer allergischen Reaktion auftretenden Symptome zu lindern bzw. zu unterdrücken. Eine Veränderung der allergischen Reaktionsfähigkeit des Immunsystems kann auf diese Weise allerdings nicht erreicht werden.

1.8.1.1 Allergenkarenz

Bei atopischen Personen ist für die Entwicklung einer allergischen Erkrankung die Sensibilisierungsphase von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund war die Meidung oder Verringerung des persönlichen Kontakts mit Allergieauslösern das primäre therapeutische Ziel. Da eine in früher Kindheit verminderte Allergenexposition mit erhöhtem Risiko späterer Sensibilisierungen einhergeht (Woodcock et al., 2004) und eine vollständige Karenz (z.B. Hausstaubmilben, Pollenflug) bloß bedingt möglich ist, wird die Allergenkarenz nur noch als tertiäre Prophylaxe bei manifester Allergie angesehen, da durch das Vermeiden erneuten Allergenkontakts eine Symptomreduktion erreicht werden kann.

1.8.1.2 Antihistaminika

In erster Linie werden Antihistaminika zur symptomatischen Behandlung der RCA eingesetzt. Diese Gruppe an Medikamenten wirkt reversibel über einen kompetitiven Antagonismus am Histaminrezeptor. Histamin-H₁-Rezeptor-Antagonisten sind hierbei von besonderer Bedeutung, da diese die histaminbedingten Schleimhautbeschwerden an Nase und Augen im Rahmen der Soforttypreaktion direkt vermindern bzw. komplett aufheben.

1.8.1.3 Beta-2-Adrenorezeptor-Agonisten

Beta-2-Adrenorezeptor-Agonisten werden als höchst wirksame Bronchodilatoren bei der Behandlung asthmatischer Symptome verwendet. Nachdem die Agonisten an Beta-2-Rezeptoren gebunden haben, kommt es zur Stimulation der Adenylatzyklase durch signaltransduzierendes Protein G und damit zu erhöhter Produktion an zyklischen Adenosin-Monophosphaten (cAMP) sowie zur Aktivierung der Proteinkinase K. Dies führt zur Linderung der asthmatischen Bronchokonstriktion durch die Relaxation glatter Muskelzellen bzw. durch die Öffnung kalziumabhängiger Kaliumkanäle (Holgate und Polosa, 2008).

1.8.1.4 Kortikosteroide

Kortikosteroide (Mineralokortikoide und Glukokortikoide) sind die potentesten antiinflammatorischen Substanzen. Aufgrund ihres Vermögens die Mastzellentwicklung sowie die Expression IgE-abhängiger FcεRI zu inhibieren, werden sie als wirkungsvolle Medikamente in der Behandlung allergischer Entzündungsreaktionen angewandt (Smith et al., 2002). Zudem verringern sie die Th2-Zell-vermittelte Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und

Adhäsionsmolekülen (Barnes et al., 1998) und vermindern die zelluläre Infiltration von APC, T-Zellen und Eosinophilen in die Schleimhaut. Mastzellen werden dagegen weniger beeinflusst. Bei regelmäßiger täglicher Anwendung reduzieren topische nasale Steroide alle Symptome der saisonalen und perennialen Rhinitis wie Nasenblockade, Rhinorrhoe, Niesen und Juckreiz sowie asthmatische Beschwerden. Ihre Wirkung entfalten freie Kortikosteroide nach der Diffusion durch die Zellmembran und Aktivierung zytoplasmatischer Glukokortikoidrezeptoren, die nach Translokation modulierend auf die Zielgene einwirken und dadurch zur Repression proinflammatorischer Gene bzw. zur Transkription von Genen antiinflammatorischer Mediatoren führen (Barnes und Adcock, 2003). Trotz ihrer hohen Effektivität sind Kortikosteroide allerdings nicht in der Lage, den natürlichen Verlauf der Allergie zu beeinflussen (Bisgaard et al., 2006; Guilbert et al., 2006).

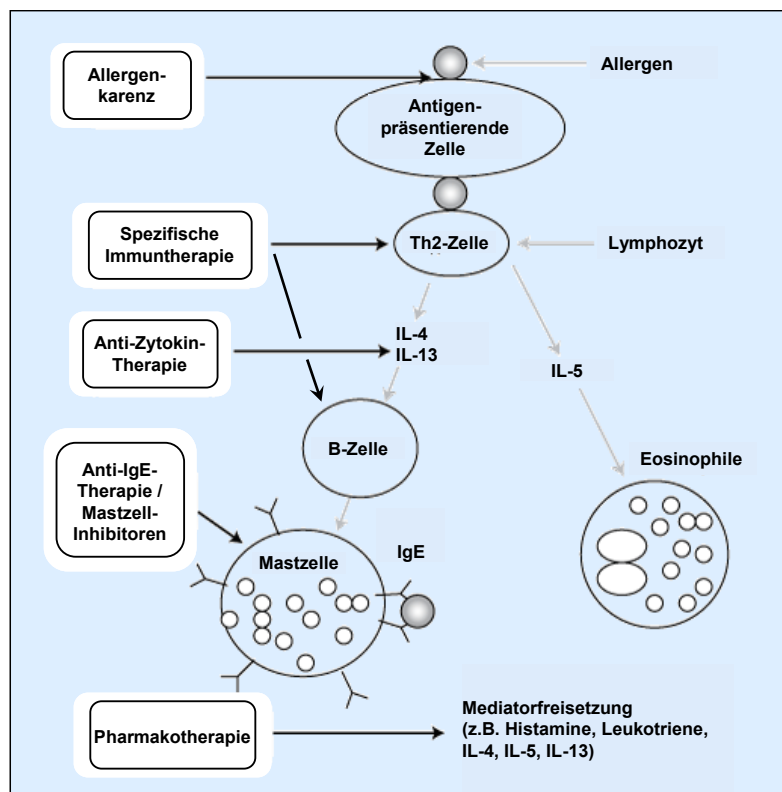


Abb. 5: Therapiemöglichkeiten bei allergischen Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp. Potentielle Therapieformen gliedern sich in kausale und symptomatische Maßnahmen. Kausale Therapieformen sind die Allergenkarrenz mit strikter Vermeidung relevanter Allergene sowie die spezifische Immuntherapie, die durch Immunmodulation auf humoraler und zellulärer Ebene als einzige Behandlungsform den Krankheitsverlauf einer Soforttypallergie beeinflussen kann. Pharmakotherapien üben ihre Wirksamkeit dagegen über die transiente Inhibition pathomechanistischer Effekte aus, die durch Zytokine, Mediatoren und Immunzellen innerhalb der allergischen Typ-I-Reaktion hervorgerufen werden (modifiziert nach Douglass und O'Hehir, 2006).

1.8.1.5 Mastzellinhibitoren

Für die Therapie allergischer Erkrankungen auf Mastzellebene stehen mit Dinatriumcromoglicat (DNCG) und Nedocromil zwei Substanzen zur Verfügung, die chemisch nicht verwandt, aber in ihrem Wirkspektrum als „Mastzellstabilisatoren“ ähnlich sind. Diese als Cromone

zusammengefassten Pharmazeutika üben ihre Wirkung über die Inhibition des Chloridionen-Transports in Mastzellen aus, wodurch der Schwellenwert für die Zellaktivierung und damit für die Degranulation erhöht wird (Alton und Norris, 1996). Weitere Strategien, die FcεRI-vermittelte Aktivierung auf Mastzellen zu unterbinden, beinhalten u.a. die Blockade des Aktivierungsmarkers CD63 durch monoklonale Antikörper sowie die Inaktivierung einer für die IgE-abhängige Mastzellaktivierung essentiellen Tyrosinkinase durch inhibitorische Moleküle (Holgate und Polosa, 2008).

1.8.2 Experimentelle Behandlungsformen

Aufbauend auf den Erkenntnissen pathophysiologischer Vorgänge der letzten Jahre wurde eine Reihe neuer therapeutischer Behandlungsformen entwickelt, die allerdings nicht oft über einen experimentellen Ansatz heraus in der Klinik Bedeutung finden.

1.8.2.1 Anti-IgE-Antikörper

Die Bindung von IgE-Antikörpern an den hochaffinen Rezeptor FcεRI auf Mastzellen, Basophilen oder Eosinophilen löst nicht nur die allergische Effektorphase aus, sondern führt zusätzlich zu einer Verstärkung der allergischen Reaktion, indem die Lebensdauer der Mastzellen erhöht und die FcεRI-Expression gesteigert wird (Asai et al., 2001; Kalesnikoff et al., 2001). Um diese folgenschwere Reaktionskette zu unterbinden, erscheint eine Therapie mit monoklonalen, gegen IgE gerichteten Antikörpern vielversprechend. Anti-IgE-Antikörper sind in der Lage, die Bindung von IgE an FcεRI zu beeinflussen, da sie das freie IgE im Serum binden. Die Wirkungsweise der anti-IgE-Antikörper spiegelt sich in einer verminderten Leukotrienfreisetzung nach Mastzellstimulation mit dem entsprechenden Allergen wider (Hamelmann et al., 2002; Kopp et al., 2002). Anti-IgE-Antikörper wurden ursprünglich entwickelt, um schweres, allergisches Asthma zu behandeln (Holgate et al., 2005), doch können bei frühzeitigem, präseasonalem Beginn auch durch Pollen hervorgerufene rhinokonjunktivale Beschwerden therapiert werden (Bez et al., 2004; Plewako et al., 2002). In diesem Zusammenhang können anti-IgE-Antikörper sowohl als Monotherapie als auch in Verbindung mit einer SIT angewandt werden (Chang, 2000; Jardieu und Fick, 1999).

1.8.2.2 Zytokin-/Antizytokintherapie

Da allergische Reaktionen hauptsächlich Th2-Zell-vermittelt sind, wurde versucht, mit zytokinbasierten Immuntherapien, das Gleichgewicht zwischen Th2- und Th1-Zellen wiederherzustellen. Dafür wurden entweder Th2-Zellzytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) durch die Verwendung biotechnologisch hergestellter Zytokinantagonisten (meist Antikörper) inhibiert oder durch den Einsatz entsprechender Zytokine (IFNγ und IL-12) Th1-Zellantworten gefördert. Wie im Kap. 1.7.1.1 beschrieben spielen die Zytokine IL-4 und IL-13 eine entscheidende Rolle beim Klassenwechsel der B-Zellen in Richtung IgE-Produktion. Daher stellt die Inhibition der Effekte dieser beiden Interleukine ein interessantes, therapeutisches Ziel dar. Bislang wurden lösliche IL-4- und IL-13-Rezeptoren bzw. IL-13-Rezeptor-spezifische monoklonale Antikörper für die Behandlung eingesetzt, doch konnten Phase III-Studien die Wirksamkeit nicht bestätigen.

Trotz der Induktion von IFN γ unter SIT waren Studien mit subkutaner Applikation von rekombinanten IFN γ bei Asthmatikern erfolglos (Boguniewicz et al., 1995).

1.8.3 Spezifische Immuntherapie

Seit fast einem Jahrhundert wird die SIT, auch Hypo- oder Desensibilisierung genannt, zur Behandlung von inhalativen Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktionen eingesetzt. Nach wie vor ist sie die einzige anerkannte, kausale Behandlungsform, die in der Lage ist, den natürlichen Krankheitsverlauf von Soforttypallergikern zu beeinflussen. Freeman und Noon waren 1911 die ersten Kliniker, die Patienten mit RCA ansteigende Dosen niedrig konzentrierter Pollenextrakte injizierten (Cohen et al., 2003). Die damals lediglich auf Erfahrungswerten beruhende SIT blieb bis zur heutigen Zeit in ihren Grundprinzipien unverändert und seit 1998 wird der therapeutische Nutzen der SIT, d.h. die Induktion immunologischer Toleranz gegenüber harmlosen Allergenen, auch offiziell von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) anerkannt (Bousquet et al., 1998). Neben der kurativen Wirksamkeit, welche in zahlreichen klinischen, randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudien nachgewiesen werden konnte (Bodtger et al., 2002; Grammer et al., 1982; Jutel et al., 2005; Passalacqua und Canonica, 2002; Walker et al., 1995), stellt die SIT gegenwärtig auch die einzige präventiv wirksame Behandlungsform respiratorischer Soforttypallergien dar. So besteht eine vorbeugende Wirkung bei der Ausbildung zusätzlicher, allergenspezifischer Sensibilisierungen (Calderon et al., 2007; Des Roches et al., 1997; Pajno et al., 2001; Purello-D'Ambrosio et al., 2001) und es kann ein Etagenwechsel der atopischen Erkrankung von einer RCA zum Asthma bronchiale verhindert werden (Jacobsen et al., 2007; Moller et al., 2002; Niggemann et al., 2006; Novembre et al., 2004; Polosa et al., 2005).

Im Verlauf der SIT werden dem Patienten nach einem bestimmten Therapieschema anfangs ansteigende Dosen des entsprechenden Allergenextrakts bzw. des rekombinanten Allergens oder allergener Peptidbestandteile subkutan injiziert (Einleitungsphase). Nach Erreichen der Erhaltungsdosis wird diese in regelmäßigen, meist monatlichen Abständen über einen Zeitraum von mindestens drei Jahren verabreicht (Erhaltungsphase), um letztendlich zur Entstehung von klinischer Toleranz, d.h. dem Ausbleiben einer spezifischen Immunreaktion gegenüber einer späteren, natürlichen Allergenexposition, zu führen. Studien zeigen, dass die Wirksamkeit der SIT mit einer Verbesserung der klinischen Symptome bis mindestens drei Jahre nach Beendigung der Therapie aufrechterhalten bleibt (Durham et al., 1999b). Der Vorteil subkutaner Allergeninjektionen wird darin gesehen, dass die auf diese Weise ausgelösten Immunantworten nicht mehr unter dem Einfluss des epithelialen Mikromilieus stehen, durch dessen Zellen und Mediatoren die Aktivierung von Th2-Zellen begünstigt werden könnte (Bellinghausen et al., 2006). Da im Epithel Allergene hauptsächlich von DZ, subkutan vor allem von Makrophagen aufgenommen werden, wird diesbezüglich diskutiert, ob sich die Immunantwort schon aufgrund der unterschiedlichen Expression kostimulierender Moleküle durch die verschiedenartigen APC verändert (Bellinghausen et al., 2006).

Die in erster Linie limitierenden Faktoren für die Durchführung einer subkutanen SIT sind das Auftreten anaphylaktischer Nebenwirkungen (Williams et al., 2004) sowie die drei- bis

fünfstufige Behandlungsdauer, die in den meisten Studien zu einer Abbruchrate von über 30% der Patienten führt (Senna et al., 2009). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zur subkutanen SIT weitere Therapieverfahren mit dem Ziel entwickelt, potentielle, schwerwiegende Allgemeinreaktionen zu verhindern, die Behandlungsdauer zu verkürzen sowie die Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit der SIT zu erhöhen.

1.8.3.1 Spezifische Immuntherapie mit chemisch modifizierten Allergenen (Allergoiden)

Eine Modifikation der klassischen subkutanen SIT stellt die Verwendung von Allergoiden dar. Bei Allergoiden handelt es sich um chemisch veränderte Allergene, bei denen durch Behandlung mittels Glutar- bzw. Formaldehyd hauptsächlich konformationelle T- und B-Zellepitope eliminiert wurden. Durch diese Form der chemischen Modifikation soll die Allergenität der für die SIT verwendeten Allergene reduziert und das Risiko möglicher anaphylaktischer Reaktionen minimiert werden. Studien konnten belegen, dass Allergoide eine stark verminderte IgE-Bindung aufweisen und dadurch ein reduziertes Aktivierungspotential für basophile Granulozyten besitzen (Wurtzen et al., 2007). Bei dieser Art der Allergenapplikation scheint jedoch neben der reduzierten Allergenität auch eine geringere Immunogenität vorzuliegen, womit die immunologische Wirksamkeit im Vergleich zu konventionellen, nativen Allergenen beeinträchtigt wäre (Lund et al., 2007; Wurtzen et al., 2007).

1.8.3.2 Spezifische Immuntherapie mit rekombinanten Allergenen

Die Nachteile bei der Anwendung von natürlichen Allergenextrakten sind vielfältig. So können bspw. Extraktpräparationen mit Allergenen anderer Quellen verunreinigt (van der Veen et al., 1996) oder undefinierbare Mengen nicht-allergener Bestandteile (z.B. Phytoprostane) enthalten sein, die in der Lage sind, eine Differenzierung des Th2-Phänotyps zu fördern (Traidl-Hoffmann et al., 2005). Rekombinante Allergene stellen dagegen Moleküle mit definierten physiko-chemischen, immunologischen, hypoallergenischen Eigenschaften in hoher Reinheit dar (Valenta und Niederberger, 2007).

1.8.3.3 Sublinguale Immuntherapie

Bei der sublingualen SIT (SLIT) wird das Allergen enoral über die Mundschleimhaut aufgenommen. Bei dieser Behandlungsform können sehr hohe Dosen an Allergen appliziert werden, ohne dass es zu systemischen Unverträglichkeitssymptomen kommt. Daher stellt diese Applikationsform eine gute Alternative zu subkutanen Injektionen, vor allem für Kinder, dar (Ozdemir et al., 2007; Valovirta et al., 2006). Dennoch können lokale Symptome einschließlich Angioödem im Mundbereich auftreten (Frew, 2008). Die Datenlage zu dieser Verabreichungsform ist dessen ungeachtet kontrovers, da noch nicht erwiesen ist, dass die SLIT die gleiche Effektivität wie die subkutane SIT aufweist und aktuell Langzeitstudien über mehrere Jahre fehlen (Kleine-Tebbe et al., 2007). Allerdings konnte bei der SLIT neben der Verbesserung klinischer Symptome ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Risiko nach

rhinokonjunktivalen auch asthmatische Beschwerden zu entwickeln, unter der Therapie signifikant reduziert ist (Novembre et al., 2004).

1.8.3.4 Modifizierte Verfahren

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Auslösung einer Immunantwort von der Dosis und Verweildauer des Antigens in den sekundären lymphatischen Organen abhängig ist (Zinkernagel et al., 1997), wurde die Möglichkeit neuer Applikationsrouten für eine SIT untersucht. So erhöhte die direkte Injektion von Pollenextrakt in inguinale Lymphknoten nicht nur die Wirksamkeit und Sicherheit der SIT, sondern verkürzte zusätzlich die Behandlungsdauer auf acht Wochen (Senti et al., 2008). Die durch lediglich drei intralymphatische Injektionen induzierte Toleranz war dabei über den bisherigen Beobachtungszeitraum von drei Jahren anhaltend und gegenüber der konventionellen, subkutanen SIT gleichwertig.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt die epikutane Verabreichung von Allergenen (Senti et al., 2009). Der Allergenextrakt wurde dafür wöchentlich über einen Zeitraum von zwölf Wochen epikutan appliziert. Trotz der signifikant reduzierten klinischen Symptome in der folgenden Pollensaison wiesen die auf diese Weise behandelten Patienten keine Verbesserung in nasalen Provokationstests (NPT) auf. Weitere Studien werden benötigt, um die verabreichte Allergendosis sowie die Anwendungsdauer zu optimieren, da diese Applikationsform eine vielversprechende, unkompliziert anwendbare Alternative zur subkutanen SIT und SLIT darstellt (Werfel, 2009).

Weitere SIT-Verfahren beinhalten das Verabreichen des Allergens in Verbindung mit Adjuvanzen wie z.B. immunmodulatorisch wirksamem Monophosphoryllipid A (Wheeler, 2006) oder CpG-Oligonukleotidmotiven (Creticos et al., 2004), den Einschluss von Allergenen in Nanopartikeln (Scholl et al., 2006) sowie die Gabe T-Zell-reaktiver Peptide (Larche, 2007). Darüber hinaus gibt es erste Ansätze für präventive Vakzinationsstrategien mit mRNA-Konstrukten, die darauf abzielen, das naive Immunsystem initial zu beeinflussen, anstatt einen manifestierten allergischen Immunphänotyp zu korrigieren (Roesler et al., 2009). DNS-basierte Vakzine werden in diesem Zusammenhang aufgrund immunpathologischer Nebenwirkungen, die mit der potentiellen Integration der Plasmid-DNS in das Wirtsgenom einhergehen können, kritischer betrachtet.

Obwohl durch die SIT prinzipiell eine Allergentoleranz erzielt werden kann, sind die letztendlich einer Verbesserung der klinischen Symptomatik zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen noch nicht abschließend geklärt. Doch werden im Zusammenhang SIT-induzierter, immunmodulatorischer Vorgänge u.a. Immunignoranz gegen harmlose Antigene, Anergie oder Deletion allergenreaktiver T-Zellen, die Induktion protektiver allergenspezifischer T-Zellantworten bzw. auf humoraler Ebene die Induktion unterschiedlicher blockierender Antikörper als potentielle Mechanismen diskutiert. Dabei rückt einerseits die zeitliche Dynamik, in der phasenabhängig unterschiedliche immunregulatorische Mechanismen wirksam zu sein scheinen, andererseits die zentrale Rolle IL-10-produzierender Tr1-Zellen bei der Induktion und

Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegenüber Allergenen während natürlicher Allergenexposition sowie bei erfolgreicher SIT immer mehr in den Fokus aktueller Studien.

2 Material

2.1 Patientenmaterial

Vollblut

Patienten der Universitätsklinik für
Dermatologie und Allergologie Marburg

2.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen

fötales Kälberserum (FCS)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

humanes Serum (PHS), Typ AB

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

L-Glutamin 200mM mit

Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10.000µg/ml)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin

Lonza, Vervies, Belgien

2.3 Zytokine und Proteinantigene

Interleukin-2 (IL-2), human

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Interleukin-7 (IL-7), human

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

Interleukin-10 (IL-10), human

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

rekombinantes Bet v 1

Biomay, Wien, Österreich

Phytohämagglutinin (PHA)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

2.4 Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; $C_{14}H_{14}N_2$)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Mallinckrodt Baker, Griesheim

Dimethylsulfoxid (DMSO; C_2H_6OS)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

Dulbecco's PBS 1x (ohne Ca^{2+} + Mg^{2+})

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Essigsäure ($C_2H_4O_2$)

Merck KGaA, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA; $C_{10}H_{16}N_2O_8$)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Schnelldorf

FACSClean

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

FACSFlow

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

FACSRinse

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)

Merck KGaA, Darmstadt

[methyl- 3H]-Thymidin

Amersham Biosciences,
Buckinghamshire, UK

Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)

Merck KGaA, Darmstadt

Natriumazid (NaN_3)

Merck KGaA, Darmstadt

N,N-Dimethylformamid (DMF; C_3H_7NO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Pancoll, human	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA; $(CH_2O)_n$)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol (C_3H_8O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Szintillationslösung MicroScint™-0	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau- Jugesheim
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tween® 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt

2.5 Puffer und Kulturmedien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
ACK-Lysis-Puffer	0,15M NH_4Cl + 1mM $KHCO_3$ + 0,1mM EDTA → auf 1l ddH ₂ O → pH 7,2 - 7,4 einstellen
FACS-Puffer	Dulbecco's PBS 1x + 1% BSA + 0,1% NaN_3 → Sterilfiltration mittels Stericup 0,22µm (Millipore) → Lagerung bei 4°C
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS 1x + 0,5% BSA + 2mM EDTA → Sterilfiltration mittels Stericup 0,22µm (Millipore) → Lagerung bei 4°C
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO
RPMI ⁺⁺	RPMI 1640 + 100U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin

2.6 Antikörper

2.6.1 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	
CD4	RPA-T4	Maus IgG ₁ , κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD25	M-A251	Maus IgG ₁ , κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD127	hIL-7R-M21	Maus IgG ₁ , κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Foxp3	FJK-16s	Ratte IgG2a, κ	PE	eBioscience, Frankfurt
Iso-K	MOPC-21	Maus IgG ₁ , κ	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	MOPC-21	Maus IgG ₁ , κ	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	MOPC-21	Maus IgG ₁ , κ	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	eBR2a	Ratte IgG2a, κ	PE	eBioscience, Frankfurt

(Iso-K = Isotypkontrolle)

2.6.2 Antikörper für Zellkultur

Spezifität	Klon	Isotyp	
CD3	UCHT1	Maus IgG ₁ , κ	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
IL-10	JES3-19F1	Ratte IgG _{2a}	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.7 Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik

BD™ ELISPOT Human IL-5 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD™ ELISPOT Human IL-10 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD™ ELISPOT Human IFN-γ ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
MACS® Zellisolations-Kit	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatorische T-Zell-Isolations-Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS® Zytokin-Sekretions-Test	
IL-10 Zellanreicherungs- und -detektions-Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

2.8 Verbrauchsartikel

6-/24-/48-well (Loch)-Platten, steril	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-well (Loch)-Rundbodenplatten, steril	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Combitips® 5ml, steril/unsteril	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen für Neubauer Zählkammer, 20x26mm	Menzel GmbH & Co. KG,
Braunschweig	
Einweg-Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Einfrier-Röhrchen (Cryo's) 2ml, steril	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (Polystyren-Röhrchen 5ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Glasfiberfilter EasyTab™-C Self-Aligning Filters	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-
	Jugesheim
MACS®, MS Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

MACS[®], LD Säulen
 Millex[®]-Sterilfilter, Porengröße 0,22µm
 Monovette[®] (CPDA)
 Monovette[®] (Serum-Gel)
 Pasteurpipetten Glas

 Pipettenspitzen
 Reaktionsgefäße 1,5ml
 Stericup[®] 250ml, 500ml, Porengröße 0,22µm
 Zentrifugen-Röhrchen 15ml, 50ml

Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
 Millipore GmbH, Schwalbach
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.
 KG, Eberstadt
 Kalensee, Gießen
 Eppendorf, Hamburg
 Millipore GmbH, Schwalbach
 Greiner, Frickenhausen

2.9 Geräte

Analysenwaage 770

 Auflicht-Mikroskop Axiostar

 CO₂-Inkubator HERAcell[®] 150

 Durchflusszytometer FACSCalibur
 Einfrierbehälter Qualifreeze

 ELISPOT Scanner Eli.Scan
 ImmunoCap[®]100^c
 inverses Mikroskop Invertoskop ID03

 Kühlzentrifuge Megafuge[®] 1.0

 Magnetrührer IKAMAG[®] RET
 Mehrkanalpipette Discovery 20-200µl
 MiniMACS[®] Separator
 Multipette[®] plus
 Neubauer Zählkammer

 pH-Meter CyberScan pH 510

 Pipettierhilfe BD Falcon[™] Express[™]
 Pipetten Research[®] 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl
 Präzisionswaage 440-49N

 Reagenz-Reservoir
 Rhinotest2000

Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-
 Frommern
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH,
 Göttingen
 Heraeus Kendro Laboratory Products
 GmbH, Langenselbold
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

 A.EL.VIS, Hannover
 Phadia AB, Uppsala, Schweden
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH,
 Göttingen
 Heraeus Kendro Laboratory Products
 GmbH, Langenselbold
 IKA Labortechnik, Staufen
 ABIMED, Langenfeld
 Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
 Eppendorf, Hamburg
 Paul Marienfeld GmbH & Co. KG,
 Lauda-Königshofen
 Eutech Instruments Europe bv, Nijkerk,
 Niederlande
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Eppendorf, Hamburg
 Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-
 Frommern
 Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
 Allergopharma, Reinbek

Sterilbank HERAsafe®	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Stickstofftank Chronos 200	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen
Szintillationsmessgerät TopCount®NXT™	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau- Jugesheim
Trockenschrank Heraeus Function Line	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Vortexmixer IKA® Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen
Zellerntegerät MicroBeta®FilterMate™	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau- Jugesheim

2.10 Software

BD CellQuest™ Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eli.Analyse ELISPOT Analysis Office Software V4.2	A.EL.VIS, Hannover
Endnote 9.0	Thomson ResearchSoft, USA
Microsoft® Excel	Microsoft, USA
Microsoft® PowerPoint	Microsoft, USA
Microsoft® Word	Microsoft, USA
SPSS® 17.0	SPSS inc., USA

3 Methoden

3.1 Patienten

In die vorliegende Studie wurde ein Kollektiv von 15 Birkenpollenallergikern im Alter zwischen 21 und 61 Jahren (Durchschnittsalter 41 Jahre) für die SIT mit Birkenpollenallergenextrakt inkludiert. Innerhalb dieser Gruppe waren neun Probanden weiblich. Als Kontrollpopulationen für den Vergleich immunologischer Veränderungen sowohl durch die SIT als auch durch natürliche, saisonale Allergenexposition fungierten einerseits sieben ausschließlich symptomatisch therapierte Birkenpollenallergiker, welche keine SIT erhielten (vier Frauen, drei Männer; Durchschnittsalter 38 Jahre; Spannweite 26-58 Jahre), andererseits acht gesunde Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie (fünf Frauen, drei Männer; Durchschnittsalter 33 Jahre; Spannweite 25-59 Jahre).

3.1.1 Einschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie

Alle Patienten wiesen eine klinisch relevante respiratorische Allergie vom Soforttyp gegen Birkenpollen mit mäßig bis schwerer saisonaler RCA und/oder kontrolliertem Asthma bronchiale allergicum auf. Das Beschwerdemaximum wurde dabei im Frühjahr erreicht. In kutan-vaskulären Testungen wie dem Prick- oder Intrakutantest sowie dem NPT waren eine IgE-vermittelte Sensibilisierung gegen Birkenpollen und demzufolge der Zusammenhang zur klinischen Symptomatik eindeutig nachweisbar. Zusätzlich wurde serologisch die Konzentration spezifischer IgE-Antikörper sowohl gegen Birkenpollenextrakt als auch rekombinantes Bet v 1 bestimmt. Jeder Patient gab vor Einschluss in die Studie sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen, welche von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg genehmigt worden waren.

3.1.2 Ausschlusskriterien für die spezifische Immuntherapie

Minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten sowie Personen, die eine Kontraindikation gegen die SIT mit Birkenpollen aufwiesen, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Kontraindikationen umfassten Polysensibilisierungen mit perennierenden Symptomen, klinisch relevante Allergien gegen weitere Pollenallergene sowie die in Tab. 1 aufgeführten Umstände, die darüber hinaus gegen eine Durchführung der SIT sprechen.

Tab. 1: Kontraindikationen zur subkutanen spezifischen Immuntherapie mit Allergenen (nach Kleine-Tebbe et al., 2009).

— Teil- oder unkontrolliertes Asthma bronchiale (Einteilung nach neuen GINA-Leitlinien, 2008) bzw. mittel- oder schwergradig persistierendes Asthma bronchiale (Einteilung nach alten GINA-Leitlinien, 2005) mit einer FEV ₁ unter 70% des Sollwerts trotz adäquater Pharmakotherapie
— Kardiovaskuläre Erkrankung mit erhöhtem Risiko von Nebenwirkungen nach Adrenalingabe (außer bei Insektengiftallergie)
— Behandlung mit β -Blockern (lokal, systemisch)**
— Schwere Autoimmunerkrankungen, Immundefizienzen
— Maligne neoplastische Erkrankung mit aktuellem Krankheitswert
— Unzureichende Compliance

3.2 Spezifische Immuntherapie und Studiendesign

Die Patienten der vorliegenden Studie erhielten eine SIT mit BPA-Extrakt nach den internationalen Richtlinien und einem standardisierten Dosierungsschema. Die Applikation des Allergenpräparates erfolgte in der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg. Mit der Initialtherapie wurde außerhalb der Birkenpollensaison begonnen (im Zeitraum zwischen September und November), so dass die Aufdosierungsphase der SIT vor dem Beginn des relevanten Pollenflugs abgeschlossen war. Dafür wurden stufenweise ansteigende Dosen des aufgereinigten und standardisierten Allergenextraktes (ALK-depot SQ) wöchentlich subkutan appliziert bis eine Erhaltungsdosis von 100.000 SQ (standardisierte Qualitäts)-Einheiten pro Injektion erreicht wurde (Abb. 6). Mit monatlicher Gabe der Erhaltungsdosis wurde die SIT anschließend über drei Jahre fortgeführt.



Abb. 6: Behandlungsplan mit verkürzter Aufdosierung für ALK-depot SQ Pollen bei allergischer Rhinitis. Das Schema zeigt die initiale Aufdosierung des Allergenpräparates während der ersten drei Monate der spezifischen Immuntherapie. Innerhalb dieses Zeitraums konnte die therapeutische Höchstdosis mit elf Aufdosierungsinjektionen erreicht werden. Die Fortsetzungsbehandlung für die folgenden drei Jahre wurde mit 1,0ml der Allergenlösung (entspricht 100.000 standardisierte Qualitäts (SQ)-Einheiten) alle vier Wochen durchgeführt (modifiziert nach ALK-Scherax).

Während der dreijährigen SIT wurden in regelmäßigen Abständen anhand eines standardisierten Fragebogens die klinischen Beschwerden und der symptomatische Medikamentenverbrauch der Patienten erhoben sowie die klinischen Verlaufsparemeter (kutan-vaskuläre Testung, nasale Provokation) bestimmt. Darüber hinaus erfolgte an definierten Zeitpunkten der SIT die Abnahme venösen Blutes für *in vitro* bzw. *ex vivo* Analysen immunologischer Parameter. Der zeitliche Verlauf des Studienprotokolls wurde so gewählt, dass die zentralen Phasen der SIT wie Einleitungs- und Erhaltungsphase sowie saisonale Birkenpollenflugzeiten und Perioden außerhalb der Pollenflugsaison erfasst wurden (Abb. 7). Die periphere Blutentnahme in den beiden Kontrollpopulationen erfolgte jeweils zu einem Zeitpunkt außerhalb der Pollenflugzeit und während saisonaler Birkenpollenexposition.

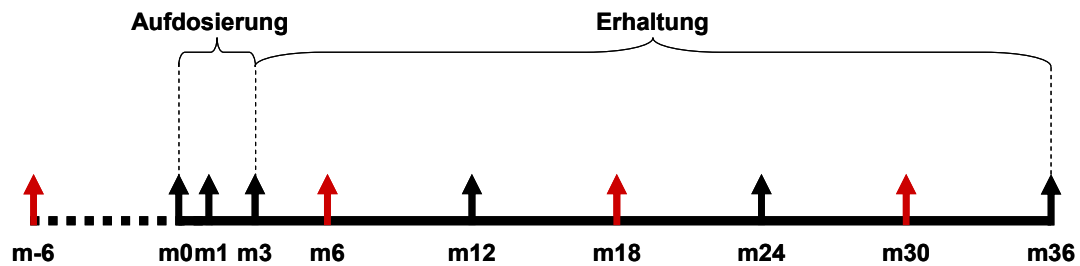


Abb. 7: Zeitlicher Ablauf des Studienprotokolls der spezifischen Immuntherapie (SIT). Der Monat (m)0 markiert den direkten Zeitpunkt vor Beginn der SIT. Die Aufdosierungs- bzw. Einleitungsphase erstreckte sich über die ersten drei Monate nach Therapiebeginn (m0 bis m3). Der weitere Verlauf der SIT (m6 bis m36) wird als Erhaltungsphase bezeichnet. Die Pfeile heben die Zeitpunkte hervor, an denen die Blutabnahmen durchgeführt wurden. Dabei stehen schwarze Pfeile für Abnahmezeitpunkte außerhalb der Birkenpollensaison, rote Pfeile stellen innerhalb der Pollenflugzeit gelegene Termine dar. Der Terminus m-6 kennzeichnet somit die der Einleitungsphase der SIT vorangegangene Birkenpollenflugzeit.

3.3 Klinische Evaluation

Die klinische Evaluation, Diagnostik sowie die Durchführung der im Kap. 3.3 beschriebenen Testungen erfolgte während dieser Studie durch ärztliche bzw. technische Mitarbeiter der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg.

3.3.1 Klinischer Symptomscore

Der klinische Symptomscore, d.h. das subjektive Allgemeinbefinden der Patienten unter SIT, wurde anhand einer numerischen Skala von 1 bis 7 ermittelt. Dabei wurde der Schweregrad der allergischen Erkrankung „überhaupt nicht krank“ (1), „Grenzfall allergischer Erkrankung“ (2), „nur leicht krank“ (3), „mäßig krank“ (4), „deutlich krank“ (5), „schwer krank“ (6) bzw. „extrem schwer krank“ (7) der nachstehenden Ziffer zugeordnet. Die subjektive Bewertung durch die Patienten erfolgte diesbezüglich zu Zeitpunkten saisonaler Birkenpollenexposition vor Therapiebeginn (m-6) sowie in den drei darauf folgenden Pollenflugzeiten unter SIT (m6, m18 und m30; vgl. Abb. 7).

3.3.2 Hautpricktest

Der Hautpricktest wurde im Gegensatz zu der Bestimmung des allergischen Schweregrades außerhalb der Birkenpollensaison direkt vor Beginn der SIT (m0) durchgeführt und anschließend im jährlichen Abstand wiederholt (m12, m24 und m36). Im Rahmen des Pricktests wurde eine BPA-haltige Lösung auf die Volarseite des Unterarms eines Patienten getropft. Mit einer Pricklanzette wurde durch den Tropfen der Allergenlösung hindurch in die Epidermis gestochen, ohne dass es zum Blutaustritt kam. Nach 5min wurde die Testlösung abgetupft und weitere 15min später erfolgte die Beurteilung der Hautreaktion. Für die Interpretation der Hautreaktion auf das untersuchte Allergen wurden eine Positiv- (0,1%ige Histaminlösung) und eine Negativkontrolle (physiologische Kochsalzlösung) mitgeführt. Aufgrund der Größe der Rötung (Erythem) und Quaddelbildung (Urtikaria) wurde der Pricktest relativ zu den Kontrolllösungen numerisch beurteilt:

- 0 = negativ → keine Quaddel, Rötung im Durchmesser nicht größer als 3mm, gleiche Reaktion wie bei der Negativkontrolle
- 0,5 = fraglich positiv → angedeutete Quaddel von 1-2mm, Rötung im Durchmesser 3-4mm
- 1 = positiv → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist kleiner als bei der Histaminquaddel
- 2 = positiv → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser entspricht der Histaminquaddel
- 3 = positiv → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel
- 4 = positiv → Quaddel mindestens 3mm, Rötung im Durchmesser mindestens 5mm, der Quaddeldurchmesser ist größer als bei der Histaminquaddel und weist zusätzlich Pseudopodien auf

3.3.3 Nasale Allergenprovokation

Die Durchführung des NPT erfolgte entsprechend den Pricktestungen bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten außerhalb saisonaler Pollenexposition mittels Rhinomanometrie, d.h. durch quantitative Prüfung des nasalen Atemwegswiderstands, und wurde nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie erhoben (Riechelmann et al., 2003). Dabei reproduziert der NPT die allergische Sofortphasenreaktion der Nasenschleimhaut auf einen inhalierbaren Stoff aus der Umwelt unter kontrollierten Bedingungen. Das vermutete krankheits- oder symptomauslösende Allergen wird auf die Nasenschleimhaut gebracht und die resultierende klinische Reaktion erfasst. Als Reaktion auf das exponierte Allergen werden die typischen nasalen Symptome Obstruktion und Hypersekretion sowie Juckreiz und Niesen aufgezeichnet. Daneben werden okuläre, kutane, bronchiale und systemische Reaktionen registriert. Die Veränderung der nasalen Luftdurchgängigkeit nach Allergenapplikation wird mittels aktiver anteriorer Rhinomanometrie erfasst. Hierzu wird die Abnahme des nasalen Volumenstroms bei einer spezifischen, transnasalen Druckdifferenz auf der initial besser durchgängigen Nasenseite objektiviert, wobei die jeweiligen Werte bei Inspiration gelten.

3.3.4 Symptomatische Medikation

Analog dem klinischen Symptomscore wurde die Änderung der symptomatischen Medikation während Phasen natürlicher Birkenpollenexposition unter der Therapie erfasst. Der Medikamentenverbrauch während der SIT wurde hierbei mittels der Skala „sehr viel mehr“ (3), „viel mehr“ (2), „etwas mehr“ (1), „unverändert“ (0), „etwas weniger“ (-1), „viel weniger“ (-2) oder „sehr viel weniger“ (-3) in Bezug zur Medikation während der Birkenpollensaison vor Initiation der Therapie (m-6) gesetzt.

3.4 Serologische Diagnostik

Die Bestimmung der Gesamtmenge zirkulierender IgE-Antikörper (Gesamt-IgE) im Serum der Patienten sowie die Untersuchung BPA-spezifischer IgE- und IgG4-Antikörper erfolgten unter

Verwendung des Phadia ImmunoCap Systems nach Herstellerangaben. In derselben Weise wurden die Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper gegen rekombinantes Bet v 1 ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung Bet v 1-spezifischer IgA- und IgG-Serumantikörper wurde analog mit Hilfe des Phadia ImmunoCap Systems durch die Klinische Forschergruppe Allergologie des Universitätsklinikums Freiburg vorgenommen.

3.5 Zelluläre Diagnostik

3.5.1 Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Eine Isolierung der für die *in vitro* Experimente benötigten PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) erfolgte aus mit Antikoagulantien (hier: Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin; CPDA) versetztem Vollblut durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Das Prinzip der Pancoll-Trennlösungen beruht auf dem Zuckerpolymer Ficoll. Dieses hydrophile Polymer wird für die Herstellung wässriger Lösungen mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet, die eine Aufreinigung humaner PBMC ermöglicht. Während

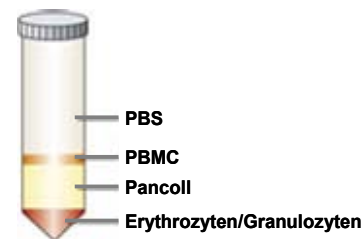


Abb. 8: Klassisches Verteilungsmuster nach Dichtegradienten-Zentrifugation
(modifiziert nach Munoz und Leff, 2006).

der Zentrifugation des CPDA-Blutes in Pancoll-Lösung kommt es zu einer Aggregation der Erythrozyten ($1,100 \text{ g/cm}^3$), die eine Erhöhung der Sedimentation dieser Zellen bewirkt. Ebenso sedimentieren Granulozyten ($1,079\text{-}1,092 \text{ g/cm}^3$) auf den Boden des Zentrifugenröhrchens. Lymphozyten ($1,070 \text{ g/cm}^3$), Monozyten ($1,065 \text{ g/cm}^3$) und Thrombozyten ($1,058 \text{ g/cm}^3$) besitzen eine niedrigere Dichte und sammeln sich daher in einer konzentrierten Bande als Grenzschicht zwischen der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und dem Pancoll an (Abb. 8). Die Aufreinigung ermöglicht den weiteren Einsatz der PBMC in funktionellen *in vitro* Experimenten.

Durchführung:

CPDA-Blut von Patienten wurde bei 1.300rpm (= 350xg; 4°C; 10min) zentrifugiert und anschließend das Blutplasma abgenommen. Das Blutplasma wurde bei -20°C eingefroren und die zellulären Blutbestandteile wurden mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die in Falcon-Röhrchen vorgelegte Pancoll-Lösung wurde vorsichtig mit dem PBS-verdünnten Blut (Verhältnis 1:3) überschichtet und bei 1.500rpm (= 450xg; 20°C; 30min) ohne Aktivierung der Bremse zentrifugiert. Die PBMC-Schicht wurde abpipettiert, in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt (1.800rpm = 550xg; 4°C; 10min), wobei nachfolgend der Überstand dekantiert und verworfen wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (1.300rpm = 350xg; 4°C; 10min) wurden die pelletierten PBMC in RPMI⁺⁺ aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.5.2 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl vitaler Zellen innerhalb einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde eine Probe mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:2 verdünnt und in die mit einem Deckglas verschlossene Neubauer-Zählkammer überführt. Der polyanionische Azofarbstoff Trypanblau dient zur selektiven Anfärbung zytosolischer Proteine in toten Zellen (dunkelblaue Anfärbung), da der Farbstoff die intakte Membran lebender Zellen nicht passieren kann und vitale Zellen dadurch farblos erscheinen. Nach der Vitalfärbung wurde die Dichte lebender Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ermittelt. Für die Berechnung der Zellzahl wurden die vier Großquadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt, wobei jedes Großquadrat mit einer Fläche von 1mm² und einer Tiefe von 0,1mm ein Volumen von 0,1µl ergibt. Mit Hilfe nachfolgender Formel wurde schließlich die Anzahl lebender Zellen innerhalb der Zellsuspension bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Summe der gezählten Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} (=2) \times 10^4$$

3.5.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

In RPMI⁺⁺ aufgenommene Zellen wurden abzentrifugiert (1.300rpm = 350xg; 4°C; 10min) und das Zellpellet in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert. Dabei wurde eine Zellzahl von 5-10x10⁶ Zellen/ml eingestellt und in Einfrier-Röhrchen überführt. Mittels spezieller, 2-Propanol befüllter Einfrierbehälter (Temperaturabnahme von 1°C/min) wurden die Zellen auf -80°C heruntergekühlt und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte in den Einfrier-Röhrchen bei 37°C in einem Wasserbad mit anschließendem Waschschrift in RPMI⁺⁺-Kulturmedium (1.300rpm = 350xg; 4°C; 10min) und darauf folgender Kultivierung.

3.5.4 Generierung allergenspezifischer T-Zelllinien

Zur Generierung von Bet v 1-spezifischen T-Zelllinien wurden PBMC von Birkenpollenallergikern *in vitro* repetitiv allergenspezifisch stimuliert. Die in Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) aufgenommenen PBMC (10⁶ Zellen/ml) wurden mit 10µg/ml Bet v 1 primär stimuliert und im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) kultiviert. Nach zwei Tagen wurde den Kulturen IL-2 (10U/ml) zugefügt, um die allergenspezifischen T-Zellen zu expandieren. Im Anschluss an eine weitere achttägige Inkubationszeit wurden die Zellen in Gegenwart des entsprechenden Allergens unter Verwendung der doppelten Anzahl autologer, bestrahlter (2x31Gy) PBMC als APC restimuliert. Bei den Stimulationsansätzen wurde alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt (nach der Restimulation ohne IL-2) und weitere 14 Tage später die Antigenspezifität getestet (siehe Kap. 3.5.5). Wiesen die auf diese Art etablierten T-Zelllinien eine Spezifität gegenüber Bet v 1 auf, wurden sie bis zur Verwendung in weiteren Experimenten kryokonserviert (siehe Kap. 3.5.3).

3.5.5 Bestimmung der Zellproliferation und Antgenspezifität

Als ein Maß für die Proliferation der Zellen wurde der Einbau des radioaktiv markierten Basenanalogs ^3H -Thymidin gemessen. Bei jeder Zellteilung findet eine Replikation der DNS statt, wodurch das im Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) überschüssige ^3H -Thymidin (2,5µCi/ml) in die DNS der proliferierenden Zellen eingebaut wird. Die Menge an in die DNS der Zellen inkorporiertem ^3H -Thymidin korreliert somit mit der Proliferation der Zellen.

Die Zellen wurden für die Bestimmung der Zellproliferation in 96-*well*-Rundbodenplatten überführt. Es folgte eine Inkubation der Zellen für fünf (T-Zelllinien) bzw. sieben Tage (PBMC) bei 37°C und 5% CO₂, wobei jedem Ansatz für die letzten 18 Stunden der Inkubationsperiode 25µl mit ^3H -Thymidin versetztes RPMI⁺⁺-Medium (20µCi/ml) zugefügt wurden. Die Zellen wurden mittels eines Zellerntegerätes (*cell harvester*) auf einen Glasfiberfilter transferiert, mehrmals gewaschen und der Filter anschließend getrocknet. Der Filter wurde in eine Mikrotiter-Filterplatte eingelegt und nach Zugabe von 25µl Szintillationsflüssigkeit pro *well* die in die DNS der Zellen aufgenommene Radioaktivität in einem Szintillationsmessgerät als Zählpulse pro Minute (*counts per minute*; cpm) bestimmt.

Die Antgenspezifität der Zellen wurde ermittelt, indem die Ansätze mit entsprechenden Antigenen inkubiert wurden. Pro Ansatz wurden 2x10⁵ PBMC bzw. 0,5 bis 1x10⁵ T-Zellen plus die 2,5fache Menge bestrahlter PBMC (2x31Gy) als APC in 96-*well*-Rundbodenplatten pipettiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Antigen (in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen) in einem Endvolumen von 200µl Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) stimuliert. Die Inkubationszeit richtete sich nach Art der Zellen mit nachfolgender Messung der Zellproliferation (s.o.). Für den Vergleich wurde eine Negativkontrolle, bestehend aus dem gleichen Ansatz ohne Zugabe von Antigen, mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA; 1%) bzw. der monoklonale Antikörper anti-CD3 (1µg/ml).

3.5.6 Frequenzanalyse allergenspezifischer Zellen mittels ELISPOT

Bei dem ELISPOT (*enzyme-linked immunospot assay*) handelt es sich um ein modifiziertes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Verfahren. Im Gegensatz zum ELISA, bei dem die Gesamtkonzentration an produziertem Zytokin bestimmt wird, ermöglicht die ELISPOT-Methode die quantitative Detektion einzelner antgenspezifischer Zellen anhand deren Zytokinsekretion nach Stimulation (Czerkinsky et al., 1988; Olsson et al., 1990). Nach Zugabe eines Antigens zu den entsprechenden Zellen setzen in der folgenden Sekretionsphase (in der Regel zwischen zwei und 24 Stunden) die antgenspezifischen Zellen Zytokine frei (Abb. 9). Die an eine feste Phase (hier hydrophobe Immobilon-P (Polyvinylidenfluorid; PVDF)-Membran) gebundenen monoklonalen *capture* Antikörper binden in unmittelbarer Nachbarschaft die von den Zellen ausgeschütteten Zytokine. Die Zellen werden anschließend durch Waschschrte entfernt. Anhand eines sekundären Detektionsantikörper wird ein weiteres Epitop der gebundenen Zytokine erkannt. Der biotinylierte Detektionsantikörper geht mit dem nachfolgend zugegebenen, enzymgekoppelten Konjugat eine Wechselwirkung ein. Nach Zugabe eines Substrates wird schließlich dort eine kolorimetrische Reaktion ausgelöst, wo antgenspezifische Zellen reagiert haben und die gebundenen Zytokine werden als farbige Punkte (*spots*) sichtbar

gemacht. Die Anzahl der detektierten *spots* auf der Membran korreliert folglich mit der Frequenz zytokinsezernierender Zellen als Antwort auf den spezifischen Antigenstimulus.

Durchführung:

Kryokonservierte PBMC wurden aufgetaut (siehe Kap. 3.5.3) und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) in die Vertiefungen einer 24-*well*-Platte eingesät. Es erfolgte die Primärstimulation der PBMC mit 10 µg/ml Bet v 1. Als Negativkontrolle fungierte ein Ansatz ohne Zugabe des Antigens. Nach 48 Stunden wurde den Zellkulturen IL-2 (10 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) zugefügt, um eine Expansion Bet v 1-spezifischer Zellen zu erreichen (McCutcheon et al., 1997). Weitere fünf Tage später wurden die PBMC mit Bet v 1 (10 µg/ml) bzw. mit PHA (1%) als Positivkontrolle restimuliert. Für die Restimulation wurden die Zellen abzentrifugiert (1.200 rpm = 300xg; 4°C; 8 min) und in RPMI⁺⁺ + 10% PHS aufgenommen. Auf die einzelnen über Nacht bei 4°C mit anti-humanen IFN γ , anti-humanen IL-5 bzw. anti-humanen IL-10 monoklonalen Antikörpern (5 µg/ml

Endkonzentration) beschichteten Membranen der ELISPOT-Platte wurden 100 µl an Kulturmedium (\pm Antigen) vorgelegt und anschließend die entsprechende Zellsuspension (2×10^5 Zellen/100 µl) hinzupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationsphase für 20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Die weitere Durchführung des ELISPOTs mit Zugabe des sekundären Detektionsantikörpers, des Enzymkonjugates Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*) und des AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Substratreagens wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgenommen (BD Biosciences). Nach der Entwicklung der *spots* und dem Trocknen der Membranen wurden diese quantitativ mit Hilfe eines automatischen Bildanalysegerätes detektiert und ausgezählt. Die Frequenz Bet v 1-spezifischer Zellen ergab sich schließlich aus dem Median der in Triplikaten bestimmten Proben. Dafür wurde die Anzahl der *spots* in der unstimulierten Probe von der *spot*-Anzahl des antigenstimulierten Ansatzes subtrahiert.

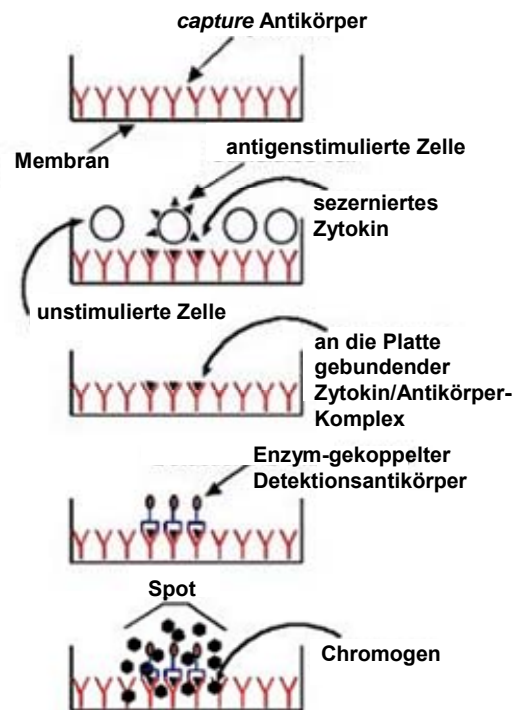


Abb. 9: Schematische Darstellung eines ELISPOTs (modifiziert nach A.EL.VIS, Hannover).

3.5.7 Isolierung humaner Zellpopulationen mittels magnetischer Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell sorting*; MACS) beruht auf der kovalenten Bindung zwischen paramagnetischen Nanopartikeln (*micro beads*) an spezifische Antikörper und der Zurückhaltung von *micro beads*-gebundenen Zellen in einem magnetischen Feld.

Durch diese Methode können gezielt bestimmte Zellpopulationen mit vergleichsweise geringem Aufwand unter sterilen Bedingungen isoliert werden.

3.5.7.1 Isolierung humaner CD4⁺CD25⁻ Effektor-T-Zellen

Die Isolierung CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen erfolgte unter Verwendung des MACS CD4⁺CD25⁺ Regulatorische T-Zell-Isolations-Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). In einem ersten Schritt wurden dabei alle Zellen, die nicht den Oberflächenrezeptor CD4 aufwiesen, durch eine indirekte magnetische Zellseparation depletiert. Der zweite Schritt resultierte in einer direkten Bindung magnetgekoppelter *micro beads* an CD25⁺ T-Zellen. Da schließlich die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im magnetischen Feld des MACS-Separators zurückgehalten wurden, konnten die nicht markierten CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen ungehindert durch die Säule fließen und für nachfolgende *in vitro* Experimente verwendet werden.

3.5.7.2 Isolierung allergenspezifischer, IL-10-produzierender Zellen

Eine spezielle Art der MACS ist die Aufreinigung bestimmter Zellpopulationen über ihre Zytokinausschüttung. Für die Analyse Bet v 1-spezifischer, IL-10-sezernierender Zellen wurden die PBMC von Birkenpollenallergikern analog dem ELISPOT-Protokoll in Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) aufgenommen und mit Bet v 1 (10µg/ml) primär stimuliert (vgl. Kap. 3.5.6). Nach 48 Stunden wurden den Zellen 10U/ml IL-2 und 10ng/ml IL-7 zugegeben. Die Restimulation der PBMC erfolgte fünf Tage später mit 10µg/ml Bet v 1. Das weitere Vorgehen richtete sich nach den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec): nach 16-stündiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen geerntet und mit anti-IL-10/CD45-Antikörperkonjugaten versetzt, die eine Bindung mit der Oberfläche aller Leukozyten eingingen. Innerhalb der anschließenden 45min andauernden Inkubationsphase erfolgte die Interaktion des durch die Zelle sezernierten IL-10 mit den auf der jeweiligen Zelloberfläche gebundenen anti-IL-10/CD45-Antikörperkonjugaten. Als nächster Schritt folgte die Bindung PE-konjugierter anti-IL-10-Antikörper sowie nachfolgend magnetgekoppelter anti-PE-Antikörper an die entsprechenden Zellen. Nach Auftrag der Zellsuspension auf die MACS-Säule wurden die IL-10-produzierenden, magnetgekoppelten Zellen im magnetischen Feld des MACS-Separators zurückgehalten, während nicht markierte Zellen ungehindert durch die Säule fließen konnten. Nach Entnahme der Säule aus dem magnetischen Feld wurden die Bet v 1-spezifischen, IL-10-produzierenden Zellen mittels MACS-Puffer aus der Säule herausgewaschen. Um die Reinheit an IL-10-positiven Zellen zu erhöhen, wurde die eluierte Zellfraktion ein zweites Mal über eine MACS-Säule gegeben.

3.5.8 Funktionelle Analyse Bet v 1-spezifischer, IL-10-produzierender Zellen

Die mit Hilfe der MACS isolierten CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen wurden in Konzentrationen von 5, 7,5 und 9x10⁴ Zellen/ml mit IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen in den Mischungsverhältnissen 1:1, 3:1 oder 9:1 kokultiviert. Den Kulturen wurden 4x10⁵ autologe, bestrahlte (2x31Gy) PBMC pro ml hinzugefügt und anschließend erfolgte die Stimulation mit anti-CD3 (1µg/ml). Um die supprimierende Bedeutung des sezernierten Zytokins IL-10 genauer zu betrachten, wurden

unkonjugierte, neutralisierende anti-IL-10 Antikörper (10µg/ml; JES3-19F1) den entsprechenden Kulturen aus Teff-Zellen und Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen zugesetzt.

In einem dritten Ansatz wurden Bet v 1-spezifische T-Zelllinien (1×10^5 Zellen/ml) mit autologen Tr1-Zellen ($1-5 \times 10^4$ Zellen/ml) in den Verhältnissen 2:1, 4:1 und 10:1 nach Bet v 1-Stimulation (10µg/ml) kokultiviert. Die Bestimmung der Zellproliferation innerhalb dieser Kokultivierungsversuche erfolgte nach fünf Tagen mittels ^3H -Thymidin-Inkorporation (siehe Kap. 3.5.5).

3.5.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*; FACS) ermöglicht die Analyse von Einzelzellsuspensionen anhand diverser Charakteristika wie Größe, Granularität, Oberflächenmolekülen oder intrazellulärer Zusammensetzung. Die Zellen werden dafür in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und durch einen laminaren Probenstrom vereinzelt an einer Lichtquelle (Laserstrahl geeigneter Wellenlänge) vorbeigeleitet. Passiert eine Zelle den gebündelten Laserstrahl, wird das auftreffende Laserlicht gestreut und dabei anhand der Lichtbeugung die Größe (Vorwärtsstreulicht) sowie durch die Brechung des Lichts die Granularität (Seitwärtsstreulicht) der einzelnen Zellen erfasst. Bei der Anwendung farbstoffgekoppelter Antikörper wird das durch angeregte Fluoreszenzmoleküle emittierte Licht definierter Wellenlängen detektiert. Die Gegenüberstellung von Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) ermöglicht eine charakteristische Darstellung der Lymphozytenpopulation bei der Auswertung der gemessenen Signale. Die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale farbstoffgekoppelter Antikörper werden vom Gerät in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen erfasst, wodurch eine zeitgleiche Detektion von bis zu vier Farbstoffen möglich ist. Dabei regt ein Argon-Ionenlaser Zellen an, die mit Fluoreszenzmolekülen wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) markiert sind. Der Diodenlaser hingegen erfasst z.B. Allophycocyanin (APC)-markierte Zellen.

Für diese Studie war hauptsächlich die Bestimmung der Expression unterschiedlicher CD-Antigene auf der Zelloberfläche humaner Lymphozyten von Bedeutung, da anhand dieser Oberflächenmoleküle lymphozytische Subgruppen sowie Differenzierungs- bzw. Entwicklungsstadien einzelner Zellgruppen charakterisiert und damit immunphänotypisiert werden konnten. Anhand der FSC/SSC-Darstellung wurde die Lymphozytenpopulation genau definiert und die Expression der Oberflächenmarker in der so eingegrenzten Zellpopulation bestimmt.

Erythrozyten produzieren Streulicht mit einer Intensität, welche mit der Intensität des von Leukozyten emittierten Streulichts vergleichbar ist. Sind in einer Probe Leukozyten und Erythrozyten vorhanden, wird das Streulicht der Erythrozyten das Streulicht von den Leukozyten überlagern. Zur Entfernung der Erythrozyten wurde CPDA-Blut einer hypoosmolaren Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat (ACK)-Lyse unterzogen. Infolge des Konzentrationsgefälles kommt es zu einem Flüssigkeitsinflux in die roten Blutkörperchen, wodurch die Zellmembranen der Erythrozyten aufgrund des osmotischen Schocks zum Platzen gebracht werden.

Das CPDA-Blut wurde im Mischungsverhältnis 1:10 mit ACK-Lysepuffer für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1.200rpm = 300xg; 4°C; 8min). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in dem gleichen Volumen an ACK-Lysepuffer resuspendiert und ein weiteres Mal für 5min inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in RPMI⁺⁺-Medium gewaschen (1.200rpm = 300xg; 4°C; 8min) und für die nachfolgende durchflusszytometrische Analyse in FACS-Puffer resuspendiert.

3.5.9.1 Nachweis von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie am Beispiel der ex vivo Frequenzanalyse CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorischer T-Zellen

Die Frequenz von CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation wurde unmittelbar nach Entnahme des peripheren Blutes bestimmt. Dafür wurden die PBMC durch ACK-Lyse aus CPDA-Blut isoliert und in FACS-Puffer aufgenommen (siehe Kap. 3.5.9). Pro Probe wurden je 1x10⁶ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und nach Zugabe von 1ml FACS-Puffer zentrifugiert (1.600rpm = 535xg; 4°C; 5min). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in FACS-Puffer aufgeschüttelt. Es erfolgte die Zugabe der farbstoffgekoppelten Antikörperlösungen bzw. der entsprechenden Isotypkontrollen (nach Herstellerangaben) mit anschließender Inkubationsphase für 20min auf Eis (in Dunkelheit). Danach wurden die Zellen zweimalig mit 1ml FACS-Puffer gewaschen (1.600rpm = 535xg; 4°C; 5min) und für die durchflusszytometrische Messung final in 250µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Quantifizierung der Zellen mittels FACSCalibur basierte auf der Expression der Oberflächenmarker innerhalb der Lymphozytenpopulation und erfolgte mittels CellQuest Software.

3.5.9.2 Nachweis intrazellulärer Proteine mittels Durchflusszytometrie

Im Anschluss an die Färbung der Oberflächenantigene erfolgte im Bedarfsfall der Nachweis intrazellulärer Moleküle. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nicht wie zuvor beschrieben in FACS-Puffer aufgenommen, sondern für 10min bei Raumtemperatur mit 0,5ml 1%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung versetzt. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen (1.600rpm = 535xg; 4°C; 5min) und zur Permeabilisierung der Zellen für 10min bei 4°C mit saponinhaltigem (0,1%) FACS-Puffer inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1.600rpm = 535xg; 4°C; 5min) konnten die farbstoffgekoppelten Antikörperlösungen bzw. entsprechenden Isotypkontrollen (nach Herstellerangaben) zugesetzt werden. Im Anschluss an die 30-minütige Inkubationsphase (auf Eis, dunkel) wurden die Zellen zweimal mit saponinhaltigem (0,1%) FACS-Puffer gewaschen (1.600rpm = 535xg; 4°C; 5min) und schließlich zur Quantifizierung in 500µl saponinhaltigem (0,1%) FACS-Puffer aufgenommen.

3.6 Statistik

Die serologischen, klinischen sowie *in vitro/ex vivo* Daten wurden aufgrund der nicht-parametrischen Verteilung als Median ± Spannweite dargestellt. Zur graphischen Veranschaulichung der Verteilung statistischer Daten wurden Box-Whisker-Plots verwendet.

Die Box gibt den Bereich an, in welchem 50% der Daten liegen und wird durch das obere 75%-Quartil und das untere 25%-Quartil begrenzt. Der Median wird als durchgängiger Balken innerhalb der Box repräsentiert. Die obere und untere Spannweite des Plots umfasst jeweils 25% der Werte. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen unterhalb des 25%-Quartils bzw. oberhalb des 75%-Quartils liegen, stellen statistische Ausreißer dar, welche durch offene Kreise (○) gekennzeichnet werden. Bei Extremwerten (*) handelt es sich um Daten, die mehr als 3 Boxlängen unterhalb des 25%-Quartils bzw. oberhalb des 75%-Quartils liegen.

Für den Vergleich gepaarter Proben zu verschiedenen Zeitpunkten während der SIT in Relation zu den Ausgangswerten vor Beginn der Therapie bzw. für den Vergleich gepaarter Proben außerhalb und innerhalb der Birkenpollensaison wurde der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Mit einem festgesetzten Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ergeben sich signifikante Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $p<0,05$. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software SPSS.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkung spezifischer Immuntherapie auf Birkenpollenallergiker

4.1.1 Klinische Wirksamkeit der spezifischen Immuntherapie

In der vorliegenden Studie wurden initial 15 Birkenpollenallergiker mit einer SIT mit BPA-Extrakt behandelt und deren klinischer Verlauf unter der Therapie über einen bis zu dreijährigen Beobachtungszeitraum dokumentiert. Die Evaluation der Effektivität der Therapie erfolgte subjektiv über die Bestimmung der klinischen Beschwerden (Symptomscore) sowie objektiv über die Reaktionen der Patienten nach Allergenapplikation bei Hautpricktests bzw. nasaler Provokation. Zusätzlich wurde die innerhalb der Pollenflugzeiten angewandte, symptomatische Medikation erfasst. Bei vier der 15 in die Studie inkludierten Patienten wurde die Therapie vorzeitig aufgrund von Umzug, Operation bzw. Schwangerschaft abgebrochen. Von den elf verbliebenen Patienten konnten in dieser Arbeit die Daten bis einschließlich des 30-Monats-Zeitpunktes (m30) analysiert werden. Zusätzlich standen die Ergebnisse von vier Probanden zur Verfügung, die bereits die SIT über den gesamten Zeitraum von drei Jahren erfolgreich beendeten. Eine nähere Charakteristik der mit SIT behandelten Patienten vor Beginn der Einleitungsphase ist zusammenfassend in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Patientencharakteristik und klinischer Zustand der in die Studie inkludierten Birkenpollenallergiker vor Einleitung der spezifischen Immuntherapie.

Patienten unter spezifischer Immuntherapie (SIT) ^a	n=15	Spannweite
Geschlecht (weiblich/männlich)	9/6	
Alter (in Jahren) ^b	41	(21-61)
Gesamt-IgE (kU/l) vor Therapiebeginn	117	(3,08-1040)
Birkenpollenallergen-spezifisches IgE (kUA/l) vor Therapiebeginn	13,6	(0,49-81,7)
Bet v 1-spezifisches IgE (kUA/l) vor Therapiebeginn	16,1	(0,48-84,3)
Symptomscore 6 Monate vor Therapiebeginn (innerhalb der Saison; m-6)	5	(6-3)
Hautpricktest vor Therapiebeginn (außerhalb der Saison; m0)	2	(4-1)

^a Daten sind als Median dargestellt

^b Mittelwert

Anhand des jeweils zur Zeit des Birkenpollenflugs erhobenen Symptomscores zeigte sich im Verlauf der SIT bei den Patienten bereits sechs Monate nach Beginn der Therapie eine klinische Wirksamkeit. Im Vergleich zu der Birkenpollensaison vor Therapiebeginn (m-6) mit einem „deutlich kranken“ Schweregrad verbesserte sich das subjektive Allgemeinbefinden der behandelten Birkenpollenallergiker signifikant zu einer „nur leichten“ Erkrankung in der darauf folgenden Birkenpollensaison (m6; $p=0,03$) auf der angewandten 7-Punkte-Skala (Abb. 10A). Der von den Patienten angegebene Schweregrad der allergischen Reaktion blieb auch in den nächsten zwei Pollenflugzeiten (m18 und m30) hinsichtlich der Angaben vor Beginn der Behandlung signifikant reduziert ($p=0,007$ bzw. $p=0,017$). Zusätzlich verringerte sich unter der

SIT die Reaktivität gegenüber BPA-Extrakt im Hautpricktest. Nach einem Jahr wiesen über 80% der Patienten (11/13) eine signifikant verminderte Reaktion der Haut nach Allergenapplikation im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Beginn der SIT auf ($p=0,03$; Abb. 10B). Nach zweijähriger Behandlung konnte eine weitere Abnahme der Hautreaktivität auf BPA-Lösung festgestellt werden ($p=0,004$), wobei die Reaktivität auch im folgenden dritten Jahr auf diesem erniedrigten Niveau blieb.

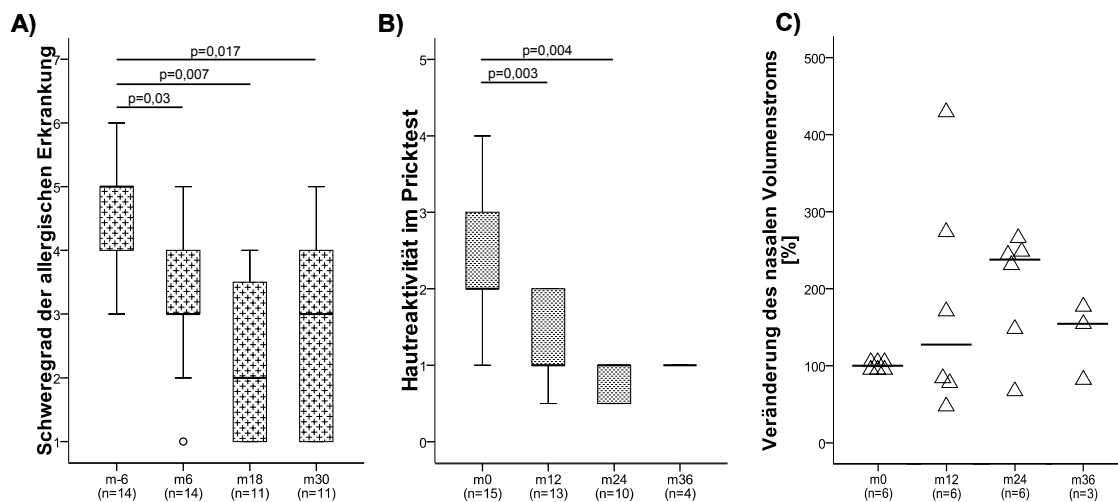


Abb. 10: Das klinische Ansprechen der Birkenpollenallergiker auf die spezifische Immuntherapie (SIT) mit Birkenpollenallergen (BPA)-Extrakt. Dargestellt ist der klinische Symptomscore, welcher zur Beurteilung der Effektivität der SIT während der Birkenpollenflugzeit ermittelt wurde (A). Der durch die Patienten subjektiv eingestufte Schweregrad der allergischen Erkrankung wurde dabei innerhalb der Birkenpollensaison vor Beginn der SIT (m-6) und jeweils im jährlichen Abstand in den drei darauf folgenden Pollenflugzeiten (m6, m18 und m30) erhoben. Eine signifikante Verbesserung des Allgemeinbefindens im Vergleich zur Birkenpollensaison vor Therapiebeginn (m-6) war bei den behandelten Birkenpollenallergikern bereits nach sechsmonatiger Behandlung zur Pollenflugzeit (m6) sowie in den beiden folgenden Birkenpollensaisons (m18 und m30) zu verzeichnen. Die klinische Effektivität der SIT wurde zusätzlich durch verminderte Hautreaktionen auf BPA im Pricktest (B) sowie in der Veränderung des Volumenstroms nach Allergenapplikation im Vergleich zu einer Vehikelkontrolle bei der nasalen Provokation belegt (C). Im Gegensatz zum klinischen Symptomscore (A) wurden hierbei die Daten in jährlichen Intervallen (m0, m12, m24 und m36) außerhalb der Birkenpollensaison erfasst. Die unter (C) dargestellten prozentualen Abweichungen beziehen sich auf den als 100% definierten Ausgangswert (m0). Statistisch signifikante Veränderungen ($p<0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m-6 bzw. m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt. Eine Signifikanzberechnung für die Veränderungen des nasalen Volumenstroms unter der SIT konnte aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt werden.

Neben der reduzierten Hautreaktivität im Pricktest konnte zudem eine verringerte Schleimhautreaktivität nach nasaler Provokation in rhinomanometrischen Untersuchungen festgestellt werden (Abb. 10C). In dem sechs Patienten umfassenden Kollektiv kam es ein Jahr nach Initiation der SIT bei der Hälfte der Probanden zu einer weniger stark ausgeprägten Abnahme des nasalen Volumenstroms bei lokaler BPA-Applikation im Vergleich zu den ermittelten Werten vor Beginn der Behandlung. Nach zweijähriger SIT konnte eine Verbesserung der nasalen Luftdurchgängigkeit bei fünf der sechs getesteten Patienten beobachtet werden. Im Gegensatz zu den vorherigen klinischen Daten blieb die Anwendung symptomatischer Medikation durch die Patienten während der Pollenflugzeiten von der SIT

größtenteils unbeeinflusst. Eine Abnahme der symptomatischen Medikation während der drei aufeinander folgenden Pollenflugzeiten war lediglich bei vereinzelt Patienten zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Veränderung humoraler Mediatoren der allergischen Immunantwort

Die durch die SIT induzierten, humoralen Veränderungen wurden im Serum der Patienten mittels ImmunoCap bestimmt. Dabei wurden neben den Gesamt-IgE-Konzentrationen der mit SIT behandelten Patienten (Tab. 2) auch die Serumkonzentrationen allergenspezifischer IgE-, IgA-, IgG- sowie IgG4-Antikörper ermittelt. Um sicherzustellen, dass bei jedem der in die Studie eingeschlossenen Patienten eine allergische Immunantwort gegenüber dem Hauptallergen der Birke vorlag, d.h. dem in den *in vitro* Versuchen eingesetzten rekombinant hergestellten Bet v 1, wurde zusätzlich zu den BPA-spezifischen IgE-Konzentrationen die für dieses Majorallergen spezifischen IgE-Antikörper bestimmt. Es zeigte sich, dass die individuellen Konzentrationen BPA- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörper innerhalb des dreijährigen Behandlungszeitraums nahezu identische Verläufe aufwiesen (Abb. 11). Darüber hinaus konnte bei einigen Patienten wiederholt während der Birkenpollenflugzeit (m6, m18 und m30) ein Anstieg allergenspezifischer IgE-Antikörper festgestellt werden (Abb. 11 und Abb. 12).

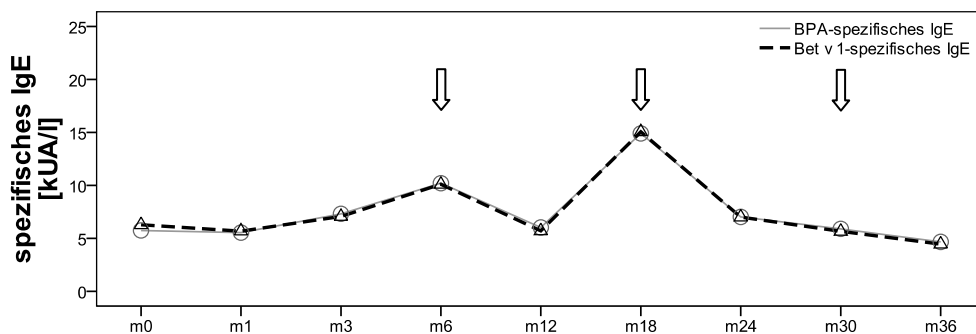


Abb. 11: Der Verlauf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer IgE- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Abgebildet ist der repräsentative Verlauf BPA- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörperkonzentrationen eines Patienten während der dreijährigen SIT (m0 bis m36). Bei allen in der Studie inkludierten Patienten waren ähnlich parallele Verläufe zwischen den spezifischen IgE-Serumkonzentrationen zu verzeichnen. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der drei aufeinander folgenden Birkenpollenflugzeiten (m6, m18 und m30).

Bei Betrachtung der Werte des gesamten Patientenkollektivs konnten allerdings weder für die Serumkonzentrationen BPA- noch Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörper innerhalb des Untersuchungszeitrahmens von 36 Monaten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Therapiebeginn beobachtet werden (Abb. 12). Es wurden jedoch auch hierbei geringe, saisonale Konzentrationsanstiege allergenspezifischer IgE-Antikörper während der Birkenpollenflugzeiten verzeichnet. Eine Zunahme spezifischer IgE-Antikörper wiesen in der ersten Saison nach Beginn der SIT 60% der untersuchten Patienten auf (m6; 9/15). Vergleichbare Anstiege konnten sowohl nach 18-monatiger (m18; 6/9; 67%) als auch nach 30-monatiger SIT (m30; 6/11; 55%) detektiert werden. Die saisonale Erhöhung der im

Patientenserum nachgewiesenen spezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen korrelierte dabei nicht mit einer Verschlechterung des allergischen Krankheitsbildes (Daten nicht gezeigt). Nach dreijähriger SIT (m36) waren tendenziell verringerte IgE-Serumkonzentrationen innerhalb der Gruppe therapeutierter Patienten zu erkennen. Allerdings lassen die zu diesem Zeitpunkt von lediglich vier Patienten vorliegenden Daten keine abschließende Aussage zu.

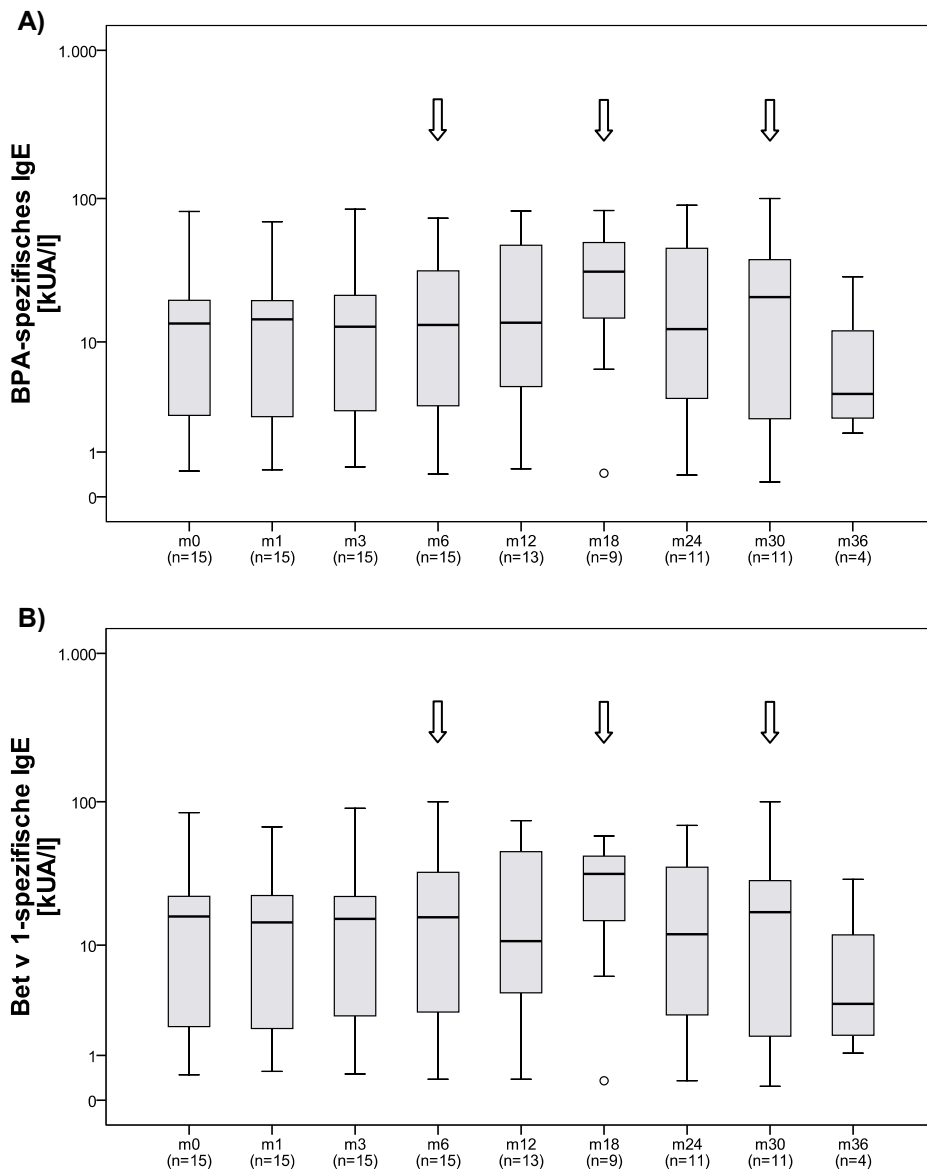


Abb. 12: Spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Die Serumkonzentrationen der Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischen (A) und Bet v 1-spezifischen (B) IgE-Antikörper zeigten während der 36-monatigen Therapie (m0 bis m36) außer geringfügigen saisonalen Anstiegen (gekennzeichnet durch Pfeile) keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den vor Beginn der SIT erhobenen Daten. Nach dreijähriger SIT (m36) war eine Tendenz zu verminderten spezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen zu erkennen, die aufgrund der geringen Fallzahl jedoch keine abschließende Aussage zulässt.

Im Gegensatz zu den allergenspezifischen IgE-Antikörpern stiegen die Serumkonzentrationen BPA-spezifischer IgG4-Antikörper bereits drei Monate nach Beginn der SIT signifikant an (m3; $p=0,007$). Im weiteren Verlauf der SIT zeigte sich über die beobachteten drei Jahre eine

kontinuierliche Zunahme BPA-spezifischer IgG4-Konzentrationen bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten (Abb. 13).

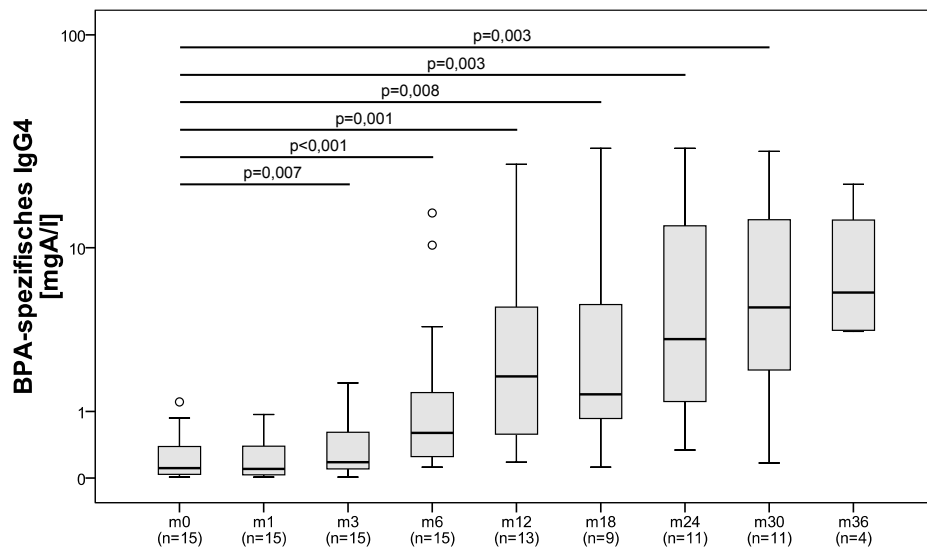


Abb. 13: Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Im Verlauf der SIT war eine signifikant erhöhte Produktion BPA-spezifischer IgG4-Antikörper bereits nach drei Monaten (m3) zu beobachten. Über die dreijährige Behandlungsdauer setzte sich diese Zunahme sukzessive fort (m6 bis m36). Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

In der vorliegenden Studie verringerte sich zudem das Verhältnis allergenspezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper. Ab dem dritten Monat nach Therapiebeginn war eine signifikante Reduktion des BPA-spezifischen IgE/IgG4-Quotienten zu beobachten (m3; $p = 0,012$), welcher während der Erhaltungsphase der SIT weiterhin sukzessive abnahm ($p = 0,001$; Abb. 14). In einigen Arbeiten konnte in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen der Verbesserung klinischer Beschwerden und einem Anstieg spezifischer Antikörper der IgG-Klasse, vor allem des IgG4-Isotyps, nachgewiesen werden (Flicker und Valenta, 2003; Wachholz und Durham, 2004), so dass der Anstieg spezifischer IgG4-Antikörper als ein potentieller humoraler Faktor für die klinische Effektivität der SIT angesehen werden kann. In der vorliegenden Studie wurden analog die Serumkonzentrationen BPA-spezifischer IgG4- und IgE-Antikörper mit den Ergebnissen der Pricktestungen, d.h. einem objektiven Parameter für die Evaluation der klinischen Effektivität, korreliert. Es ist zu erkennen, dass bei nahezu allen Patienten eine inverse Korrelation zwischen BPA-spezifischen IgG4-Antikörperkonzentrationen und der Reaktivität gegenüber BPA-Extrakt im Hautpricktest besteht (Abb. 15A). Mit Zunahme spezifischer IgG4-Antikörper im Serum der Patienten ging eine Reduktion der Hautreaktivität nach Allergenapplikation einher. Das gleiche Ergebnis konnte bei der Korrelation der Hautreaktivität im Pricktest mit dem IgE/IgG4-Verhältnis beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen lag keine Beziehung zwischen der Hautreaktivität im Pricktest und der Serumkonzentration an BPA-spezifischen IgE-Antikörpern vor (Abb. 15B).

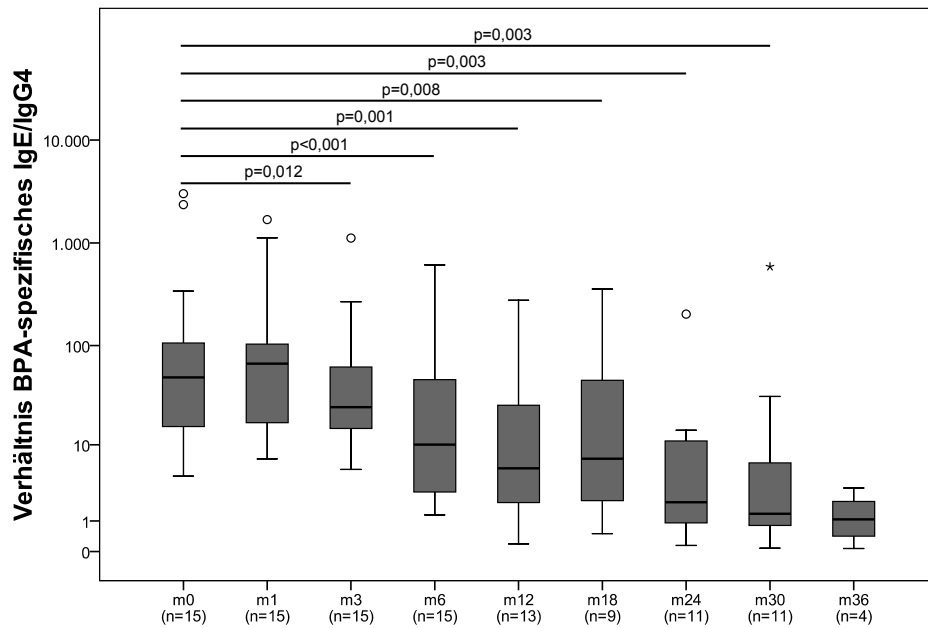


Abb. 14: Das Verhältnis Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Unter Therapie war ein kontinuierlicher, ab dem dritten Monat (m3) signifikanter Rückgang des BPA-spezifischen IgE/IgG4-Quotienten zu verzeichnen. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

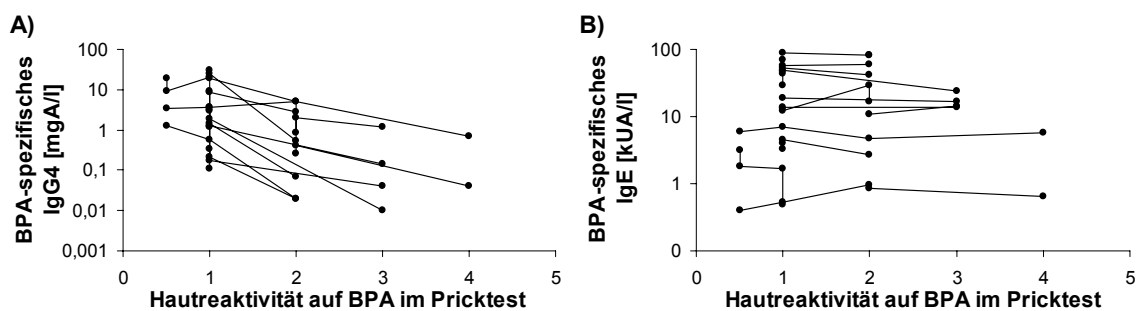


Abb. 15: Die Beziehung zwischen der Reaktion im Hautpricktest und den Birkenpollenallergen (BPA)-spezifischen Antikörpern. In (A) ist die inverse Korrelation zwischen der Reaktion nach Allergenapplikation im Hautpricktest und der Serumkonzentration an BPA-spezifischen IgG4-Antikörpern im Verlauf der bis zu dreijährigen spezifischen Immuntherapie dargestellt. Eine Korrelation zwischen BPA-spezifischen IgE-Antikörpern und einer Verminderung der Hautreaktion war nicht zu beobachten (B).

In Zusammenarbeit mit der Klinischen Forschergruppe Allergologie des Universitätsklinikums Freiburg konnte zusätzlich bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten die Serumkonzentrationen von β 1-spezifischer IgA- und IgG-Antikörper für das erste Jahr unter SIT bestimmt werden. Die allergenspezifischen IgA-Konzentrationen zeigten keine Veränderungen während der ersten zwölf Monate unter SIT und blieben auf einem konstant geringen Niveau (Abb. 16A). In gleichem Maße wie bei den BPA-spezifischen IgG4-Konzentrationen kam es zu einem signifikanten Anstieg spezifischer IgG-Antikörper nach dreimonatiger SIT im Vergleich zu den Ausgangswerten zu Beginn der Therapie (m3; $p = 0,002$; Abb. 16B). Eine stetige Erhöhung der IgG-Antikörperkonzentrationen konnte im weiteren Verlauf der SIT ausgemacht werden (m6

und m12; $p \leq 0,001$). Auffallend ist der parallele Verlauf allergenspezifischer IgG-Antikörper im Vergleich zu den Konzentrationen des IgG4-Isotyps (Abb. 17A-D).

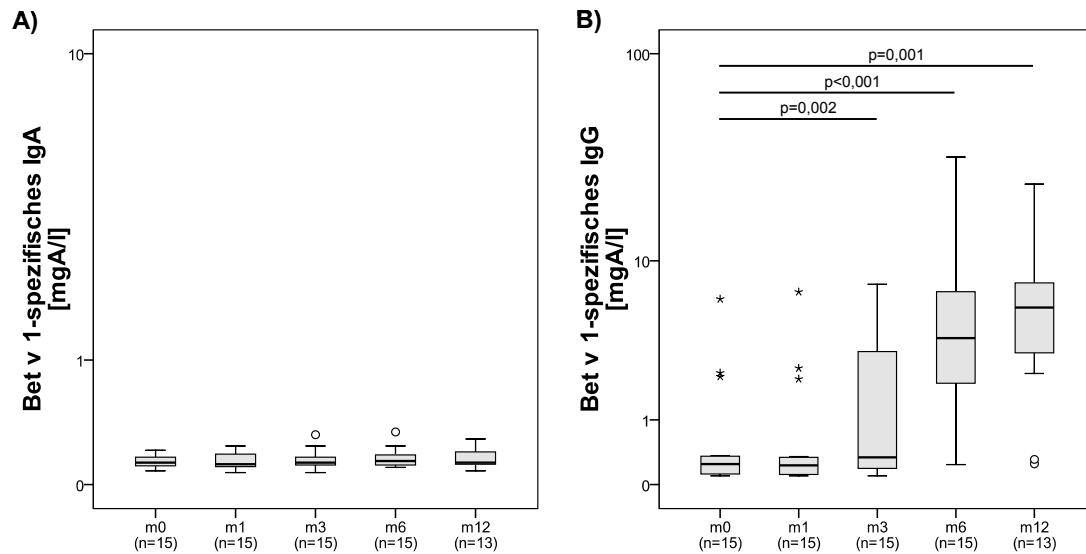


Abb. 16: Bet v 1-spezifische IgA- und IgG-Antikörperkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). In den Seren SIT-behandelter Allergiker konnten im zeitlichen Verlauf der Therapie keine Veränderungen in den Konzentrationen Bet v 1-spezifischer IgA-Antikörper beobachtet werden (A). Hingegen fand sich ein signifikanter Anstieg Bet v 1-spezifischer IgG-Antikörper ab dem dritten Monat unter Therapie (m3), welcher im weiteren Verlauf des ersten Jahres der SIT kontinuierlich zunahm (B). Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

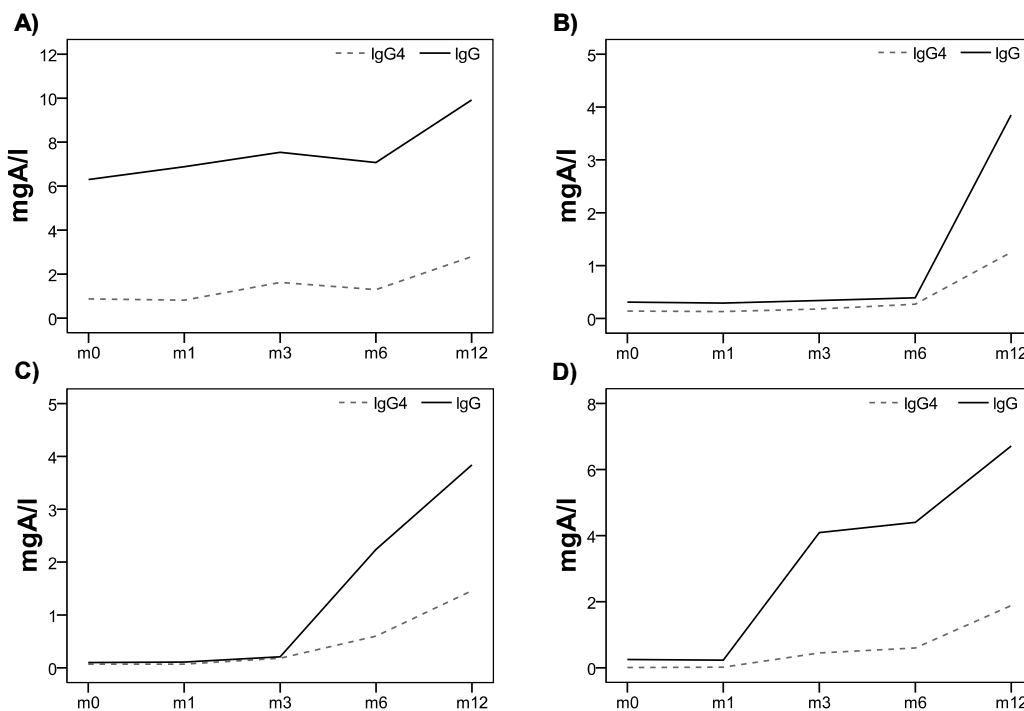


Abb. 17: Allergenspezifische IgG- und IgG4-Serumkonzentrationen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Dargestellt sind die repräsentativen Einzelverläufe allergenspezifischer IgG- und IgG4-Antikörper in den Seren von vier Birkenpollenallergikern (A-D) während der ersten zwölf Monate (m0 bis m12) unter SIT.

4.1.3 Frequenzen Bet v 1-spezifischer T-Zellpopulationen im Verlauf der spezifischen Immuntherapie

Zusätzlich zu den Veränderungen der humoralen Antwort kann die SIT auch Modifikationen auf zellulärer Ebene bewirken. Daher wurden das Vorkommen und die Frequenz allergenspezifischer T-Lymphozyten untersucht, um potentielle immunologische Einflüsse der SIT auf T-Zellebene zu ermitteln. Nach Bet v 1-Stimulation bzw. in PHA-Mitogeneseassays wurde die Anzahl der Zellen, die durch die Sekretion spezifischer „Markerzytokine“ charakterisiert sind, mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens quantitativ ermittelt (Abb. 18). Anhand der Freisetzung der Zytokine IFN γ , IL-5 sowie IL-10 wurden die Zellen hierbei spezifischen T-Zellsubpopulationen zugeordnet. So repräsentieren die durch IFN γ -Produktion hervorgerufenen Punkte (*spots*) allergenspezifische Th1-Zellen. Analog wurden die Bet v 1-spezifischen IL-5⁺ *spots* den allergieassoziierten Th2-Zellen zugeordnet. Die nach Allergenstimulation auf die Produktion des Zytokins IL-10 zurückgehenden Punkte stellen potentielle Tr1-Zellen dar.

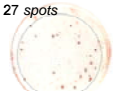
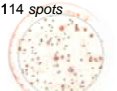
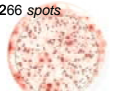
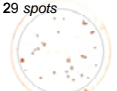
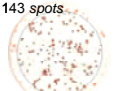
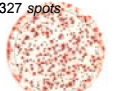
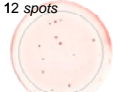
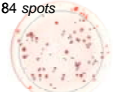
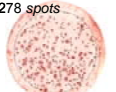
	Kontrolle	Bet v 1	PHA
IFN γ (Th1)	27 spots 	114 spots 	266 spots 
IL-5 (Th2)	29 spots 	143 spots 	327 spots 
IL-10 (Tr1)	12 spots 	84 spots 	278 spots 

Abb. 18: Die quantitative Bestimmung zytokinproduzierender Zellen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens. Veranschaulicht sind repräsentative Membranen mit unstimulierten (Kontrolle), Bet v 1- und als Positivkontrolle Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten PBMC. Jeder Punkt (*spot*) stellt eine zytokinproduzierende Zelle dar, die entsprechend der Markerzytokine Interferon (IFN) γ , Interleukin (IL)-5 und IL-10 den jeweiligen T-Zellpopulationen, d.h. T-Helfer (Th)1-Zellen, Th2-Zellen bzw. Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen zugeordnet wurde. Zur Berechnung der Anzahl an Zellen, die eine spezifische Zytokinantwort auf Bet v 1 oder PHA zeigten, wurden die unspezifischen *spots* der unstimulierten Kontrolle von den antigenstimulierten Proben subtrahiert. Die Ergebnisse geben die Anzahl an *spots* pro 2×10^5 PBMC wieder.

Neben den Th-Zellen sezernieren auch andere Zelltypen die Zytokine IFN γ und IL-5. IFN γ wird zwar überwiegend von CD4⁺ Th1-Zellen gebildet, doch produzieren ebenfalls Monozyten/Makrophagen, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen dieses Zytokin. Das hauptsächlich von CD4⁺ Th2-Zellen freigesetzte Zytokin IL-5 wird ebenso von Eosinophilen und Mastzellen sezerniert. Um auszuschließen, dass die IFN γ ⁺ bzw. IL-5⁺ *spots* auf eine andere Zellgruppe als Th-Zellen zurückzuführen sind, wurden CD4⁺ Zellen mittels magnetischer Zellseparation aus der PBMC-Fraktion isoliert und der ELISPOT unter den gleichen Bedingungen wie zuvor mit CD4⁺ depletierten PBMC durchgeführt. In der Abb. 19 ist am Beispiel IL-5- und IFN γ -sezernierender Zellen zu erkennen, dass die beiden Zytokine fast ausschließlich nach Allergenstimulation von PBMC-Fraktionen produziert werden, die CD4⁺

Zellen enthalten. Außer Th1-Zellen weisen auch NK-T-Zellen den Oberflächenmarker CD4 auf. Daher kann im Fall der $\text{IFN}\gamma^+$ spots eine Produktion durch NK-T-Zellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die genaue Charakterisierung der IL-10^+ Tr1-Zellen ist im Kap. 4.1.6 beschrieben.

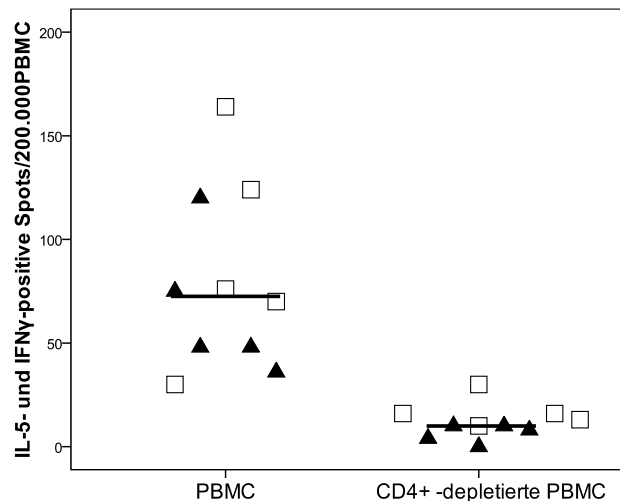


Abb. 19: Die Produktion der Zytokine Interleukin (IL)-5 und Interferon (IFN) γ durch CD4^+ Zellen. Dargestellt ist die mittels ELISPOT-Verfahren ermittelte Anzahl Bet v 1-spezifischer IL-5^+ (▲) und $\text{IFN}\gamma^+$ (□) spots ausgehend von 2×10^5 PBMC bzw. 2×10^5 PBMC nach Depletion CD4^+ Zellen mittels magnetischer Zellseparation. Zur Berechnung der Anzahl an Zellen, die eine spezifische Zytokinantwort auf Bet v 1 zeigten, wurden die unspezifischen spots der unstimulierten Kontrolle von den Bet v 1-stimulierten Probe subtrahiert. Die Ergebnisse geben die Anzahl an spots pro 2×10^5 PBMC bzw. pro 2×10^5 CD4^+ -depletierter PBMC wieder.

Entsprechend der in Abb. 18 veranschaulichten Vorgehensweise wurden die zytokinproduzierenden Zellen mittels ELISPOT über den dreijährigen Verlauf der SIT für die behandelten Patienten bestimmt. In der Aufdosierungsphase (m0 bis m3) waren keine Veränderungen in der Anzahl IL-5-produzierender Zellen zu erkennen (Abb. 20). Ein signifikanter Anstieg allergenspezifischer, IL-5-sezernierender Zellen war allerdings sechs Monate nach Beginn der SIT innerhalb der Birkenpollensaison zu verzeichnen (m6; $p=0,025$). Nach zwölfmonatiger Therapie (m12) sank die Frequenz der Th2-Zellen tendenziell unter das Niveau vor Einleitung der SIT. Diese verminderte, wenn auch nicht signifikant reduzierte Anzahl an allergenspezifischen Th2-Zellen fand sich bis zum Ende der SIT (m36). Auffällig ist die fehlende Zunahme Bet v 1-spezifischer, IL-5-produzierender Zellen innerhalb der zweiten (m18) bzw. dritten (m30) Birkenpollensaison im Vergleich zur ersten Pollenflugzeit (m6).

Bei der Frequenz Bet v 1-spezifischer, $\text{IFN}\gamma$ -sezernierender Zellen waren keine signifikanten Unterschiede über den gesamten Behandlungszeitraum von drei Jahren zu beobachten (Abb. 21). Allerdings zeigte sich ähnlich dem Verlauf Bet v 1-spezifischer, IL-5-produzierender Zellen eine Zunahme der $\text{IFN}\gamma^+$ Zellen während der ersten Birkenpollenflugsaison unter SIT (m6). Saisonale Anstiege in der Zellfrequenz waren im folgenden Zeitraum bis 36 Monate nach SIT-Beginn nicht mehr zu detektieren.

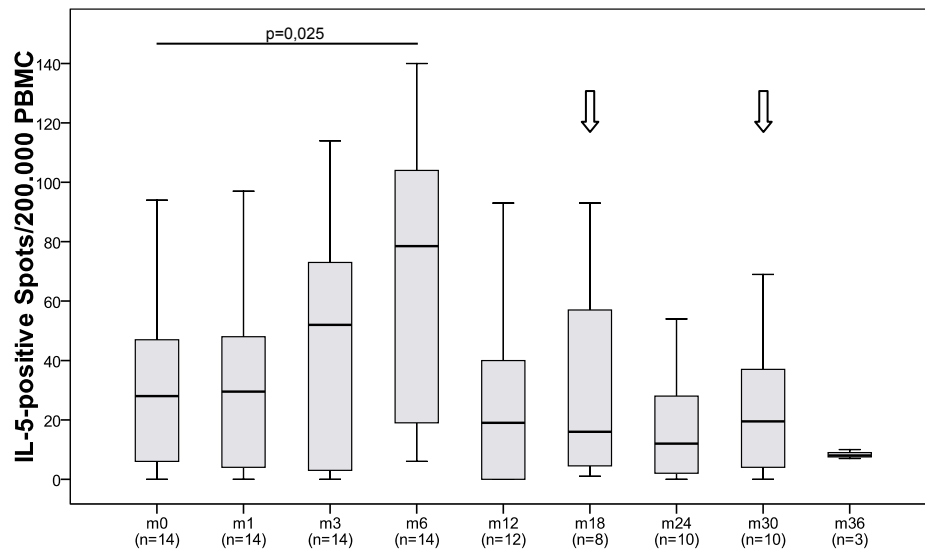


Abb. 20: Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Ein signifikanter Anstieg allergenspezifischer, Interleukin (IL)-5-produzierender Zellen war im Vergleich zu den Ausgangswerten (m0) ausschließlich während der ersten Birkenpollensaison (m6) nach Beginn der Therapie zu beobachten. In den darauf folgenden Pollenflugzeiten (m18 und m30; gekennzeichnet durch Pfeile) war dagegen keine Zunahme an Th2-Zellen zu verzeichnen. Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-5⁺ spots pro 2x10⁵ PBMC dar. Statistisch signifikante Veränderungen (p<0,05) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

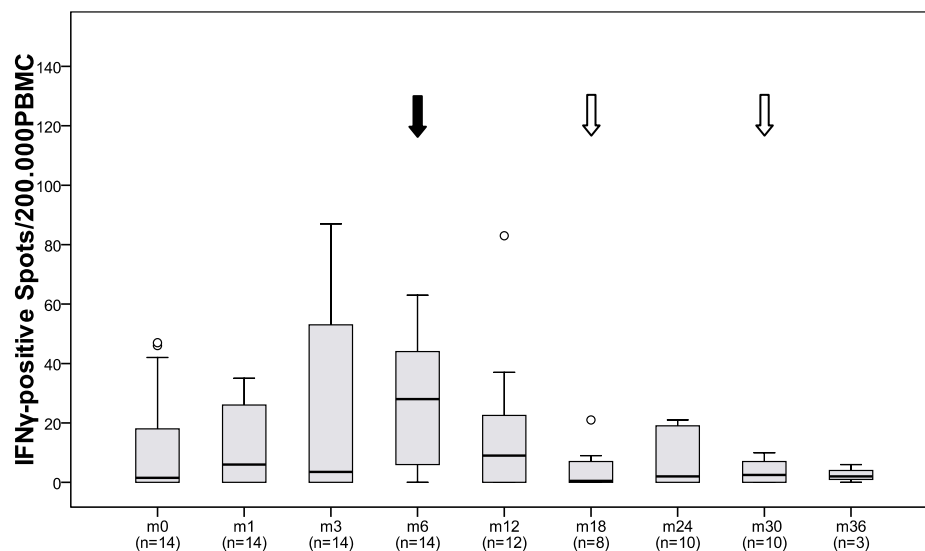


Abb. 21: Die Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 1-Zellen unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Signifikante Veränderungen allergenspezifischer, Interferon (IFN)γ-produzierender Zellen im Vergleich zu den Ausgangswerten (m0) waren über den dreijährigen Verlauf der SIT nicht zu beobachten. Lediglich die Tendenz eines saisonalen Anstiegs (m6; gekennzeichnet durch schwarzen Pfeil) der Zellen war während der Pollenflugsaison innerhalb des ersten Behandlungsjahres festzustellen. Diese tendenzielle Zunahme war in den beiden folgenden Birkenpollensaisons nicht mehr zu detektieren (m18 und m30; gekennzeichnet durch weiße Pfeile). Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IFNγ⁺ spots pro 2x10⁵ PBMC dar.

4.1.4 Induktion Bet v 1-spezifischer, Interleukin-10-produzierender T-Zellen unter spezifischer Immuntherapie

Im Gegensatz zu den Bet v 1-spezifischen Th-Zellpopulationen führte die SIT zu einer erheblichen Beeinflussung allergenspezifischer, IL-10-sezernierender Zellen (Abb. 22). Ein signifikanter Anstieg dieser potentiellen Tr1-Zellen konnte bereits drei Monate nach Therapiebeginn ermittelt werden (m3; $p=0,01$). Wie zuvor bei den allergenspezifischen Th1- sowie Th2-Zellen war die maximale Anzahl an IL-10-produzierenden Zellen nach sechsmonatiger Behandlung während der ersten Birkenpollensaison unter SIT zu verzeichnen (m6; $p=0,003$). Obwohl es im weiteren Beobachtungszeitraum zu einer Abnahme dieser Zellen kam, blieb die Frequenz IL-10-produzierender Zellen auch noch nach einjähriger Therapie im Vergleich zum Vorbehandlungsniveau signifikant erhöht (m12; $p=0,049$), um ab Monat 18 wieder auf ähnliche Zellzahlen wie vor der Einleitung der Therapie zu sinken.

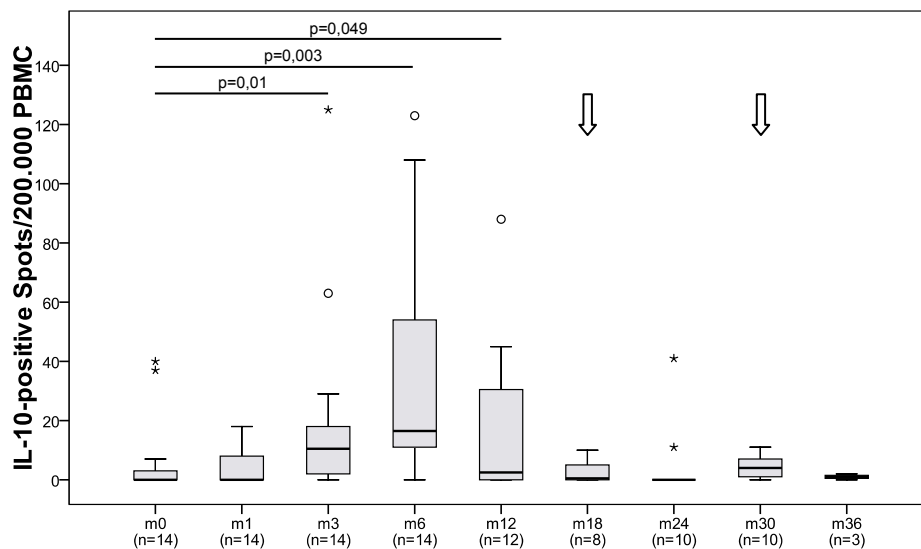


Abb. 22: Die Induktion Bet v 1-spezifischer, Interleukin (IL)-10-produzierender Zellen durch die spezifische Immuntherapie (SIT). Ein signifikanter Anstieg allergenspezifischer, IL-10-sezernierender Zellen war bereits nach dreimonatiger Therapie zu erkennen (m3). Die signifikante Erhöhung der Zellen blieb mit einem Maximum innerhalb der Birkenpollensaison (m6) bis zu einem Jahr unter Behandlung bestehen (m12). Im anschließenden Verlauf der SIT war kein weiterer Anstieg allergenspezifischer, IL-10-produzierender Zellen, auch nicht zu Zeitpunkten natürlicher Allergenexposition (m18 und m30; gekennzeichnet durch Pfeile), zu detektieren. Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-10⁺ spots pro 2×10^5 PBMC dar. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Dass es sich bei den ermittelten Frequenzunterschieden innerhalb der Gruppe behandelter Patienten tatsächlich um allergenspezifische, SIT-induzierte Veränderungen handelt und nicht um eine allgemeine Aktivierung der Zellen, wurde mittels mitogener PHA-Stimuli überprüft. Die Frequenzen zytokinproduzierender Zellen zeigten im Fall aller drei untersuchter Zytokine keine wesentlichen auf die Therapie zurückzuführenden Veränderungen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 36 Monaten (Abb. 23).

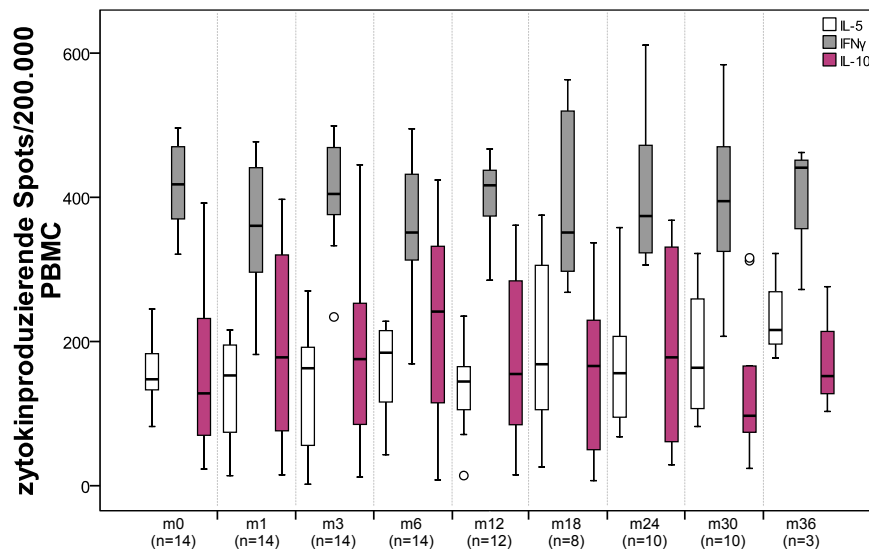


Abb. 23: Die Frequenzen der Interleukin (IL)-5-, Interferon (IFN) γ - und IL-10-produzierenden Zellen nach Phytohämagglutinin (PHA)-Stimulation. Die mittels ELISPOT-Analyse ermittelten Zellfrequenzen zeigten nach mitogenem PHA-Stimulus keine Veränderungen im Verlauf der dreijährigen spezifischen Immuntherapie mit Birkenpollenextrakt. Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl zytokinsezernierender spots pro 2×10^5 PBMC dar.

4.1.5 Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen unter spezifischer Immuntherapie

Neuere Studien zeigen, dass nicht nur die Quantität einer bestimmten Zellpopulation zur Ausprägung eines Krankheitsbildes beiträgt, sondern dass vielmehr das Verhältnis einzelner Subpopulationen zueinander den Schweregrad der Erkrankung bestimmt. Eine Korrektur des Ungleichgewichts zwischen unterschiedlichen T-Zellpopulationen scheint somit zu einer Verbesserung des allergischen Krankheitsbildes beitragen zu können und ein entscheidender Faktor bei einer erfolgreichen Toleranzinduktion während der SIT zu sein (Akdis et al., 2004). Aus diesem Grund wurde das Verhältnis zwischen potentiell protektiven allergenspezifischen Th1- bzw. Tr1-Zellen zu den pathogenetisch relevanten Bet v 1-spezifischen Th2-Zellen bestimmt. Der Quotient Bet v 1-spezifischer Th2- zu Th1-Zellen blieb dabei zu Beginn der SIT relativ konstant (Abb. 24). Eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Ausgangswerten konnte nach einjähriger Therapie festgestellt werden (m12; $p=0,016$). Interessanterweise fand sich eine derartige Reduktion jedoch nicht mehr im weiteren Verlauf der SIT.

Im Vergleich zum Quotienten Bet v 1-spezifischer Th2- zu Th1-Zellen verringerte sich das Verhältnis allergenspezifischer Th2- zu Tr1-Zellen dagegen unter Therapie bereits frühzeitig am Ende der dreimonatigen Aufdosierungsphase (m3; $p=0,016$; Abb. 25). Diese Reduktion war zudem nach zwölfmonatiger SIT noch zu beobachten (m12; $p=0,028$). Bemerkenswert ist, dass die Abnahme des Bet v 1-spezifischen Th2/Tr1-Zellverhältnisses auch innerhalb der ersten Birkenpollensaison nach Einleitung der SIT trotz gleichzeitig starken Anstiegs IL-5-produzierender Th2-Zellen Bestand hatte (m6; $p=0,022$). Darüber hinaus blieb der Th2/Tr1-Zellquotient über den gesamten Verlauf der SIT unter dem zum Zeitpunkt m0 ermittelten Niveau.

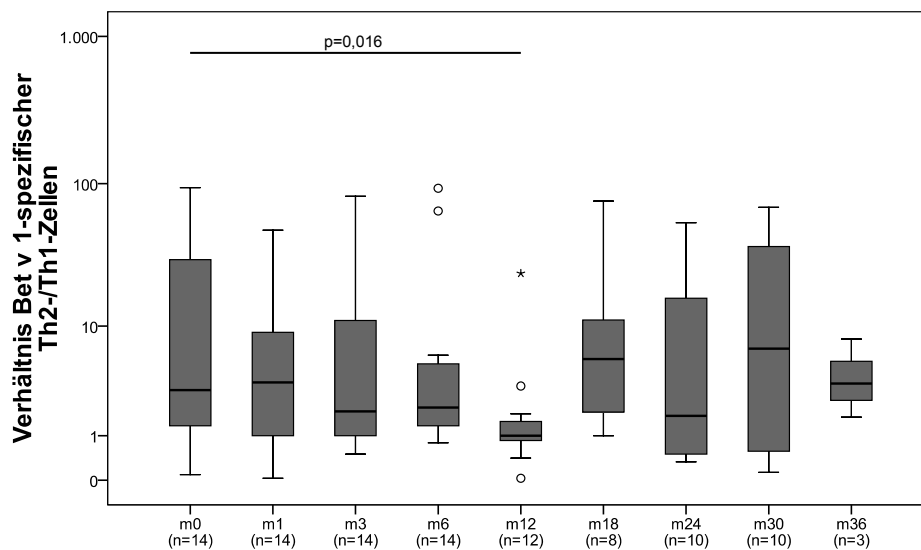


Abb. 24: Die durch die spezifische Immuntherapie (SIT) induzierten Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Th1-Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis allergenspezifischer Interleukin-5-sezernierender Th2-Zellen zu Interferon γ -produzierenden Th1-Zellen im Verlauf der SIT über drei Jahre (m0 bis m36). Eine signifikante Abnahme war lediglich nach einjähriger Therapie zum Zeitpunkt m12 zu sehen. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

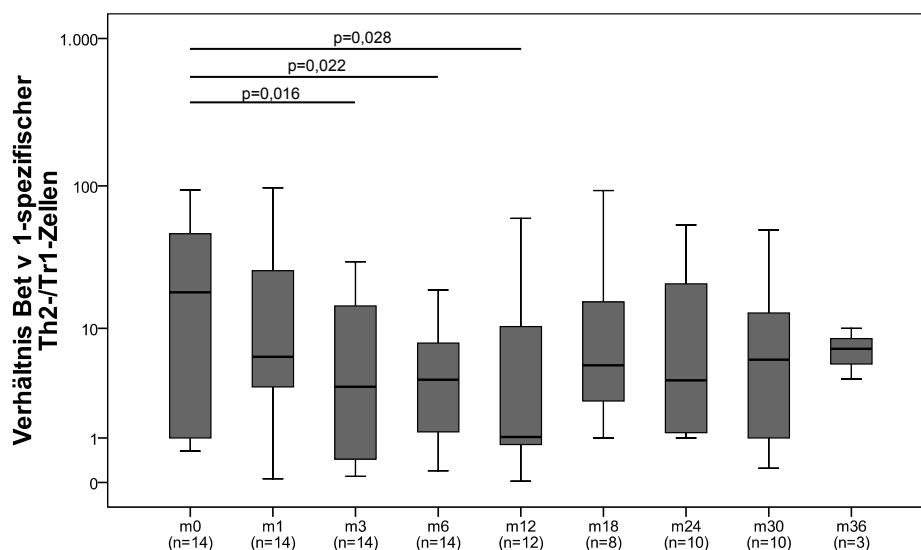


Abb. 25: Die durch die spezifische Immuntherapie (SIT) induzierten Veränderungen im Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2- zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen. Eine signifikante Verringerung des Th2/Tr1-Zellverhältnisses war bereits drei Monate nach Beginn der SIT (m3) zu erkennen. Diese Abnahme setzte sich bis zum einjährigen Beobachtungszeitpunkt (m12) fort. Das Verhältnis dieser Zellen blieb auch während der ersten Birkenpollensaison (m6) im Vergleich zum Therapiebeginn reduziert, obwohl die Frequenzen der Bet v 1-spezifischen Interleukin (IL)-5- und IL-10-produzierender Zellen zu diesem Zeitpunkt einen Anstieg aufwiesen (vgl. Abb. 20 und Abb. 22). Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert vor Beginn der SIT (m0) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

4.1.6 Charakterisierung induzierbarer, Bet v 1-spezifischer, Interleukin-10-sezernierender Tr1-Zellen

Die Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen wird als entscheidender Faktor auf zellulärer Ebene bei einer erfolgreichen SIT angesehen. Eine genaue Zuordnung dieser Zellen ist über die Zytokinexpression kaum möglich, da neben Tr1-Zellen eine Vielzahl weiterer Lymphozyten-Subpopulationen IL-10 sezernieren. So ist eine IL-10-Produktion u.a. bei Th2-Zellen, Foxp3⁺ Treg-Zellen, B-Zellen sowie NK-Zellen und NK-T-Zellen beschrieben. Ein wesentliches funktionelles Charakteristikum der Tr1-Zellen ist ihre Fähigkeit, nach antigenspezifischer Stimulation die Proliferation von Teff-Zellen zu supprimieren. Die nähere Analyse der SIT-induzierten, Bet v 1-spezifischen, IL-10⁺ Zellen sollte daher Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den im ELISPOT ermittelten, IL-10-sezernierenden Zellen um allergenspezifische Tr1-Zellen handelt. Zur Untersuchung ihrer supprimierenden Aktivität auf die Proliferation von Teff-Zellen wurde eine Reihe von Kokultivierungsversuchen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden IL-10-sezernierende, Bet v 1-spezifische Zellen (d.h. vermeintliche Tr1-Zellen) und autologe CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zusammen kultiviert sowie mit monoklonalen anti-CD3-Antikörpern bzw. allergenspezifisch mit Bet v 1 stimuliert. Die von drei verschiedenen Birkenpollenallergikern isolierten, Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen wiesen nach anti-CD3-Stimulus keine, anhand der Inkorporation von ³H-Thymidin in die DNS proliferierender Zellen ermittelte, Zunahme der Proliferation auf (unstimuliert: 118 ± 129cpm; anti-CD3: 129 ± 117cpm; Abb. 26). Dagegen zeigten die peripheren CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen derselben Donoren eine stark erhöhte proliferative Antwort nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern (unstimuliert: 58 ± 7cpm; anti-CD3: 15320 ± 14988cpm). Diese Proliferation der Teff-Zellen wurde nach Zugabe der gleichen Anzahl an Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen um bis zu 95% supprimiert (Teff-Zellen: 15320 ± 14988cpm; Teff-Zellen + Tr1-Zellen: 586 ± 846cpm; Abb. 26A). Durch die Veränderung des Verhältnisses von Teff-Zellen zu Tr1-Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass der supprimierende Effekt in direkter Abhängigkeit zu der Anzahl Bet v 1-spezifischer Tr1-Zellen stand (Abb. 26A). Wurde bei den Suppressionsversuchen ein gegen IL-10 gerichteter Antikörper zu den Kulturen gegeben, konnte der supprimierende Effekt der Tr1-Zellen nahezu vollständig aufgehoben werden (Teff-Zellen: 4784 ± 3651cpm; Teff-Zellen + Tr1-Zellen: 2478 ± 2501cpm; Teff-Zellen + Tr1-Zellen + anti-IL-10: 4423 ± 3434cpm; n=3; Abb. 26B). Das Aufheben der supprimierenden Aktivität der IL-10-produzierenden Tr1-Zellen durch die Zugabe von anti-IL-10-Antikörpern zeigt, dass die Suppression des Teff-Zellwachstums durch einen IL-10-abhängigen Mechanismus verursacht wird. Zusätzlich zu der Suppression der anti-CD3-induzierten Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen durch Tr1-Zellen wurden die supprimierenden Eigenschaften dieser Zellpopulation auf Bet v 1-spezifische T-Zelllinien untersucht. Dafür wurden allergenspezifische T-Zelllinien von vier in die Studie eingeschlossenen Birkenpollenallergikern generiert (unstimuliert: 57 ± 19cpm; Bet v 1: 9771 ± 4380cpm). Nach Kokultivierung der Bet v 1-spezifischen T-Zelllinien mit autologen, allergenspezifischen Tr1-Zellen wurde analog zu den Versuchen mit CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellen die Bet v 1-induzierte Proliferation der Effektorzelllinien nahezu gänzlich supprimiert (T-Zelllinie: 9771 ± 4380cpm; T-Zelllinie + Tr1-Zellen: 468 ± 750cpm; Abb. 26C).

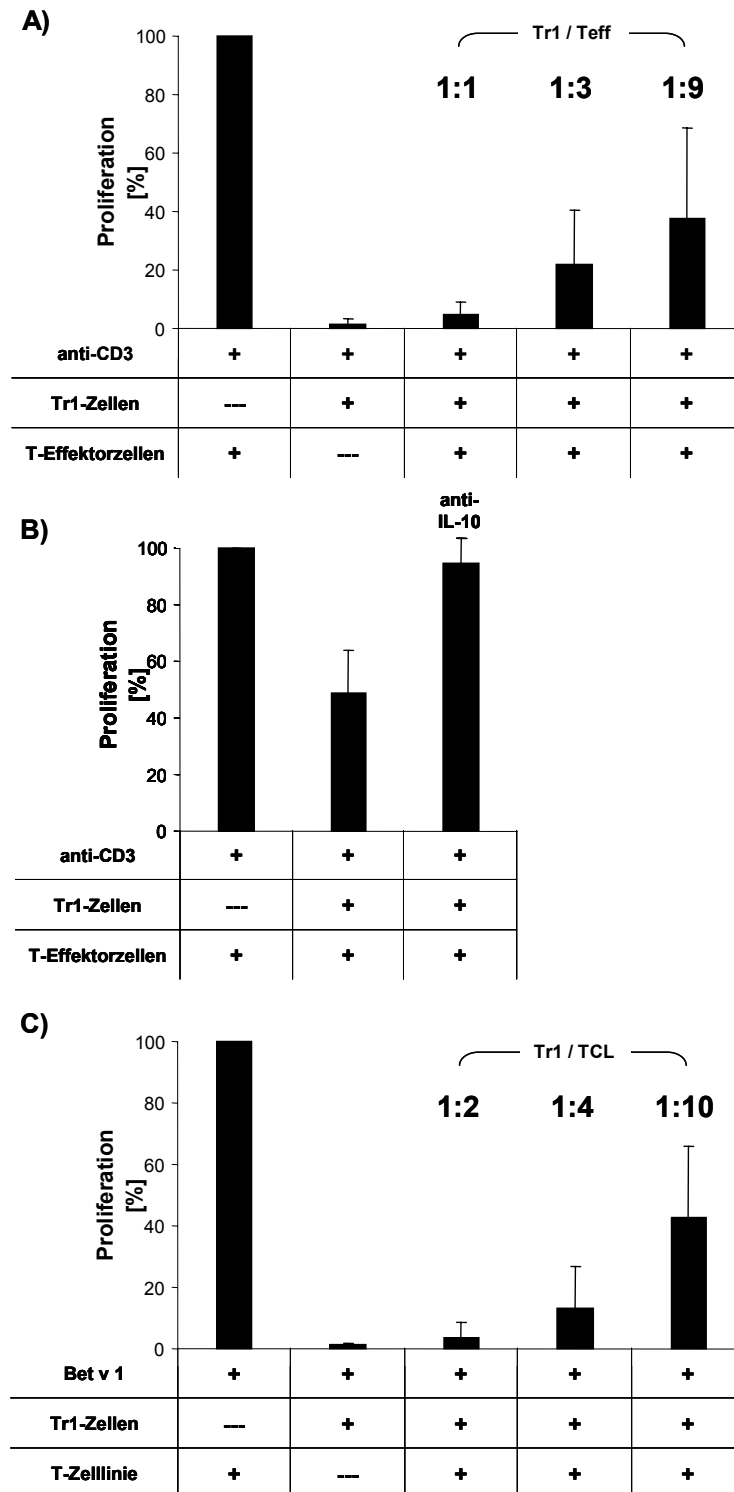


Abb. 26: Die supprimierende Aktivität Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen. A) Bet v 1-induzierte, Interleukin (IL)-10-sezernierende Tr1-Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit autologen CD4⁺CD25⁻ T-Effektorzellen (Teff) in Gegenwart bestrahlter, autologer PBMC mit anti-CD3 stimuliert. B) Die supprimierende Kapazität der Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen konnte durch die Zugabe von anti-IL-10-Antikörpern aufgehoben werden. C) Kokultivierungsversuche mit Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen und autologen, allergenspezifischen T-Zelllinien (*T cell line*; TCL) als Teff-Zellen. Die Ergebnisse der Suppressionsversuche der einzelnen Probanden wurden als Prozentsatz in Relation zur Proliferation der antigenstimulierten Teff-Zellen (definiert als 100%) dargestellt. Die Balkendiagramme geben den prozentualen Mittelwert der Proliferation \pm Standardabweichung von drei (A und B) bzw. vier Patienten (C) wieder.

Wiederum war die Tr1-Zell-induzierte Suppression der T-Zelllinien abhängig vom Verhältnis der Anzahl an Effektor- zu Tr1-Zellen (Abb. 26C). Die durch die SIT induzierten, Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen üben demnach ihre supprimierende Aktivität in einer Zellzahl- und IL-10-abhängigen Art und Weise aus. Neben IL-10 wird auch TGF- β als ein wesentlicher Faktor für die supprimierenden Mechanismen allergenspezifischer Teff-Zellantworten, vor allem für die Suppression mukosaler, allergenspezifischer T-Zellaktivierung, angesehen (Akdis et al., 2004; Jutel et al., 2003). In dieser Studie spielte jedoch IL-10 eine übergeordnete Rolle bei der Suppression von Teff-Zellantworten, da allein durch die Blockade des IL-10-Rezeptors die T-Zellproliferation wiederhergestellt werden konnte. Darüber hinaus konnte im gleichen experimentellen Ansatz der supprimierende Effekt auf das Teff-Wachstum anstelle der Kokultivierung mit allergenspezifischen Tr1-Zellen durch die ausschließlich exogene Gabe von IL-10 erreicht werden (Abb. 27).

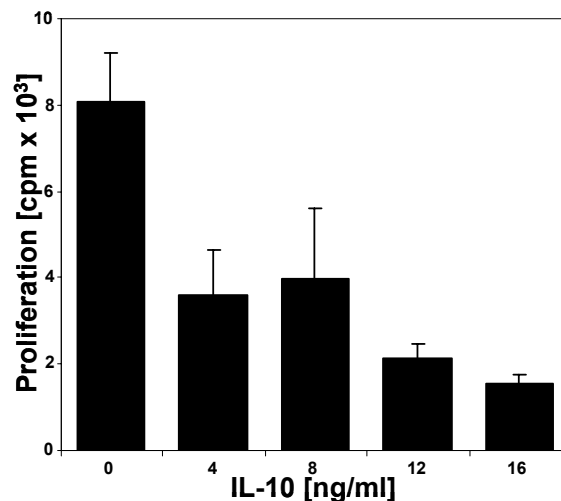


Abb. 27: Die supprimierende Wirkung des Zytokins Interleukin (IL)-10. CD4⁺CD25⁻ T-Effektorzellen wurden in Gegenwart bestrahlter, autologer PBMC mit anti-CD3 stimuliert. Eine unspezifische, dosisabhängige Suppressoraktivität konnte in den *in vitro* Experimenten nach exogener Zugabe unterschiedlicher IL-10-Konzentrationen festgestellt werden. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert der Proliferation \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. cpm, counts per minute.

Um eine Kontamination der über die allergenspezifische IL-10-Sekretion separierten Zellen mit Foxp3⁺ Treg-Zellen auszuschließen, wurden die Tr1-Zellen durchflusszytometrisch näher charakterisiert. Die Abb. 28 stellt die Daten einer repräsentativen, zum Zeitpunkt saisonaler Allergenexposition gewonnenen PBMC-Fraktion (m6) dar. Die über allergenspezifische IL-10-Sekretion mittels magnetischer Zellseparation isolierten Zellpopulationen wiesen über 85% CD3⁺CD4⁺ T-Zellen auf (n=2). Darüber hinaus konnte in diesen Populationen keine Foxp3-Expression nachgewiesen werden, wodurch eine Kontamination peripherer, Bet v 1-spezifischer, IL-10-sezernierender Tr1-Zellen durch natürliche oder in der Peripherie induzierte Foxp3⁺ Treg-Zellen ausgeschlossen werden kann. Zusammengefasst spiegeln diese Daten insgesamt den Phänotyp der gut charakterisierten Tr1-Zellen wieder (Bacchetta et al., 2002; Roncarolo et al., 2006).

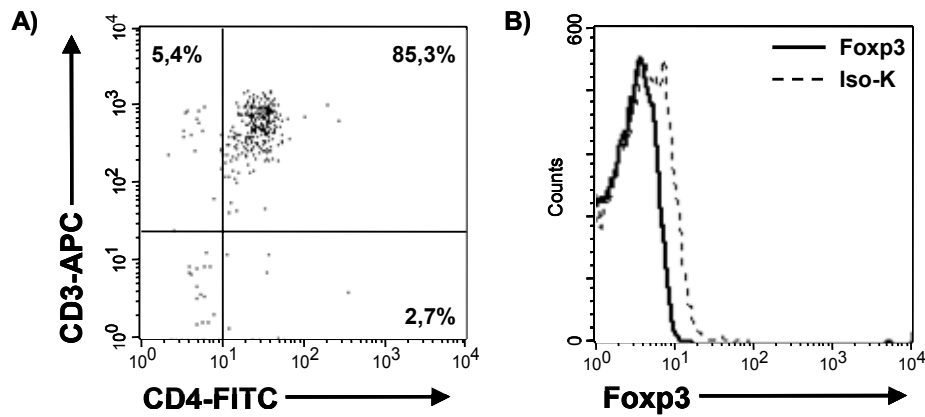


Abb. 28: Die durchflusszytometrische Charakterisierung Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen. A) Dargestellt ist der Anteil $CD3^+CD4^+$ T-Zellen innerhalb der Population mittels magnetischer Zellseparation isolierter IL-10-sezierender Lymphozyten. B) Die durchflusszytometrische Analyse isolierter Bet v 1-spezifischer Tr1-Zellen eines repräsentativen Birkenpollenallergikers unter spezifischer Immuntherapie zeigt während saisonaler Allergenexposition (m6) keine Unterschiede in der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 zwischen Isotypkontrolle (Iso-K) und Tr1-Zellen.

4.1.7 Auswirkungen der spezifischen Immuntherapie auf die Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T-Zellen

Im Gegensatz zu den induzierbaren, allergenspezifischen Tr1-Zellen repräsentieren die $Foxp3^+$ Treg-Zellen eine Treg-Subpopulation, die nach Aktivierung in der Lage ist, Teff-Zellen in einer zellkontakt-, aber nicht zytokinabhängigen Weise zu supprimieren. Weiterhin scheinen sie, wie beschrieben, im Rahmen der Inhibition Th2-Zell-vermittelter, allergischer Immunantworten eine wichtige Rolle zu spielen (Bellinghausen et al., 2003; Stassen et al., 2004). Neuere Studien zeigen zudem, dass dieser Zelltyp durch die Herunterregulation des Oberflächenantigens CD127 gekennzeichnet ist und daher die Kombination der Oberflächenantigenexpression $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ ein geeignetes, alternatives Markerprofil für die Frequenzbestimmung $Foxp3^+$ Treg-Zellen darstellt (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006).

Um die Auswirkungen der SIT auf die Frequenz dieser Treg-Zellpopulation zu ermitteln, wurde die Anzahl der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen im peripheren Blut von Birkenpollenallergikern analysiert, die eine SIT erhielten. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass die Bestimmung der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen unmittelbar nach Abnahme des peripheren Blutes stattfinden musste, da ihr Anteil in kryokonservierten PBMC stark abnimmt (Abb. 29). Diese unlängst auch von einer weiteren Gruppe beschriebene Beobachtung (Elkord, 2009) führte dazu, dass die Frequenzbestimmung $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen nur bei den fünf zuletzt in die Studie eingeschlossenen Patienten durchgeführt werden konnte.

Die durchflusszytometrische Messung der Lymphozyten von SIT-behandelten Patienten zeigte, dass im Gegensatz zu Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen keine wesentlichen Veränderungen in der Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen im Rahmen der SIT induziert wurden (Abb. 30). Lediglich marginale individuelle Unterschiede konnten bei den analysierten Probanden ausgemacht werden, wobei der Median der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen zwischen den untersuchten Zeitpunkten in Bezug zum Ausgangswert vor Beginn der Therapie relativ konstant

blieb. Zum Zeitpunkt m30 innerhalb der Pollenflugzeit lässt sich jedoch ein tendenzieller Anstieg der untersuchten $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen beobachten, welcher aufgrund der geringen Fallzahl ($n=3$) nur bedingt eine Beurteilung zulässt.

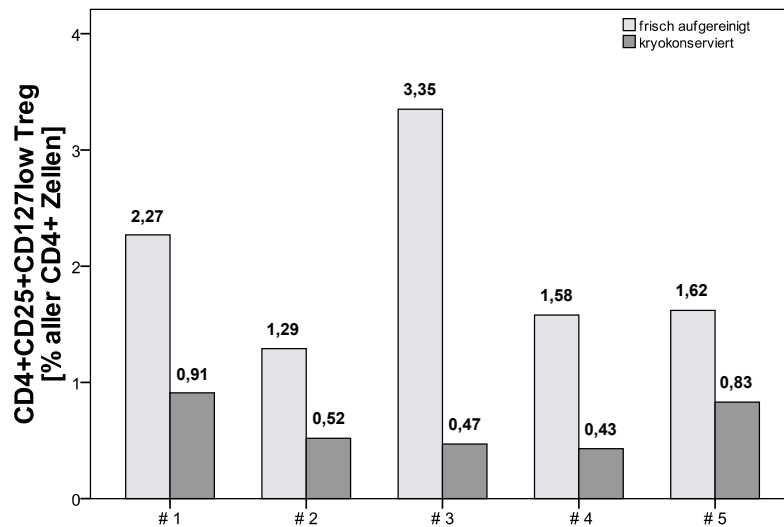


Abb. 29: Der Einfluss der Kryokonservierung auf die durchflusszytometrische Analyse $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T (Treg)-Zellen. Veranschaulicht ist die verminderte Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen nach der Kryokonservierung im Vergleich zur unmittelbar durchgeführten durchflusszytometrischen Analyse bei fünf unterschiedlichen Probanden (# 1 bis # 5).

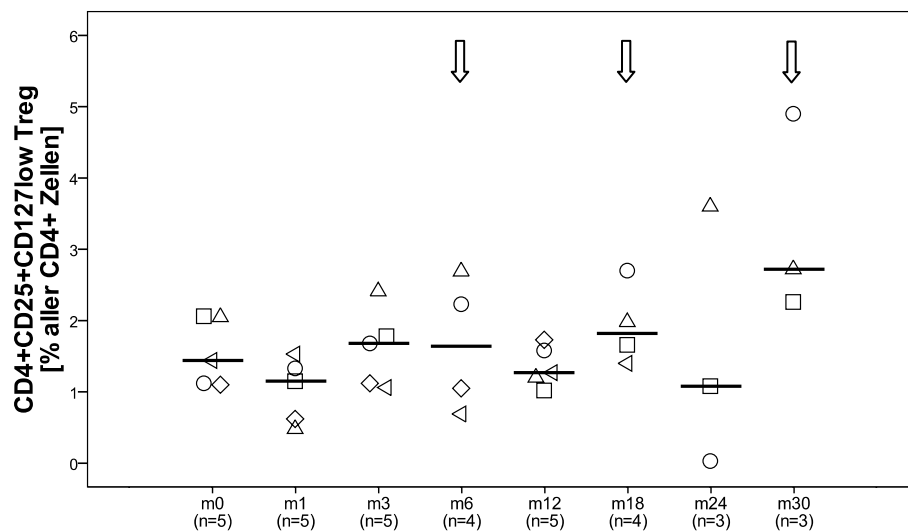


Abb. 30: Die Frequenz $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T (Treg)-Zellen im Verlauf der spezifischen Immuntherapie (SIT). Die Anzahl an $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen blieb während der ersten zwei Jahre unter Therapie relativ konstant. Zum Zeitpunkt 30 Monate nach Einleitung der SIT (m30) lagen tendenziell erhöhte Frequenzen an $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen vor. Die Treg-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie über die Oberflächenmarker $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ als eine Subpopulation aller $CD4^+$ peripheren Blutlymphozyten bestimmt. Die Zeitpunkte der drei aufeinander folgenden Birkenpollenflugzeiten während der SIT (m6, m18 und m30) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.2 Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf Birkenpollenallergiker und gesunde Probanden

Typ-I-Allergien werden durch eine unverhältnismäßige Th2-Immunantwort gegenüber nicht pathogenen Umweltallergenen hervorgerufen. Die gleichen Expositionsbedingungen führen dagegen in nicht-allergischen Personen zu einer Allergentoleranz. Um den Einfluss der natürlichen Allergenexposition während der Pollensaison von SIT-induzierten Veränderungen abzugrenzen, wurden die klinische Symptomatik, die Serumkonzentrationen allergenspezifischer Antikörper sowie die Frequenz allergenspezifischer Th- und Treg-Zellen zusätzlich sowohl bei ausschließlich symptomatisch behandelten Birkenpollenallergikern als auch bei gesunden Probanden bestimmt.

4.2.1 Der Schweregrad allergischer Symptome unter natürlicher Allergenexposition

Im Vergleich zu den Patienten unter SIT zeigte sich bei den symptomatisch behandelten Allergikern in zwei aufeinander folgenden Birkenpollensaisons keine signifikante Veränderung des Symptomscores (Abb. 31).

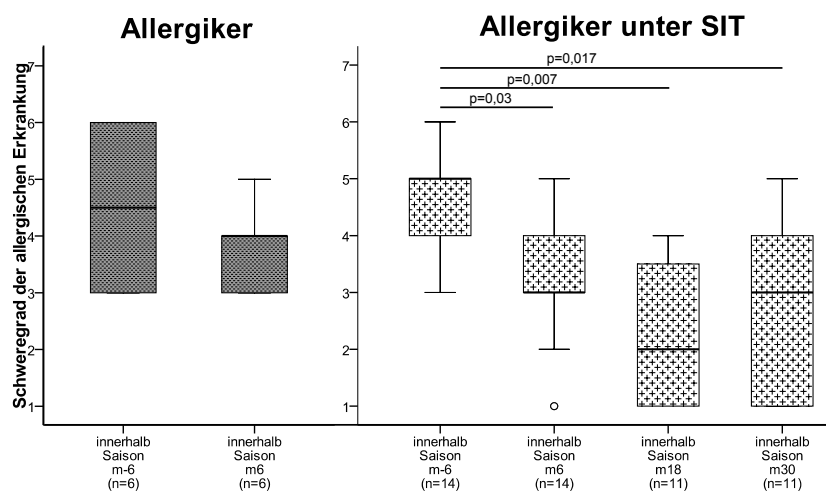


Abb. 31: Der Schweregrad der allergischen Erkrankung unter natürlicher Birkenpollenexposition. Der subjektiv eingestufte Schweregrad der allergischen Erkrankung wurde von symptomatisch therapierten und mit spezifischer Immuntherapie (SIT) behandelten Patienten in zwei (Allergiker) bzw. vier (Allergiker unter SIT) aufeinander folgenden Birkenpollenflugzeiten erfasst. Eine signifikante Veränderung des Allgemeinbefindens im Vergleich zur Ausgangsbirkenpollensaison (m-6) war nur bei den Birkenpollenallergikern unter SIT zu beobachten. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert (m-6) wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Das subjektive Allgemeinbefinden unter natürlicher Allergenexposition verringerte sich innerhalb der Pollenflugzeit lediglich von einem „deutlich“ bis „schwer kranken“ Zustand (m-6) auf einen „deutlich kranken“ Schweregrad in der Pollenflugzeit des folgenden Jahres (m6). Im gleichen Zeitraum konnte dagegen eine signifikante, klinische Wirksamkeit der SIT, die sich in einer Reduktion des Symptomscores von einem „deutlich kranken“ hin zu einem „nur leicht kranken“ Schweregrad der allergischen Erkrankung äußerte, in den therapierten Patienten beobachtet werden. Das Allgemeinbefinden der Patienten unter SIT blieb dabei über den gesamten

Beobachtungszeitraum innerhalb der natürlichen Birkenpollenexposition signifikant verringert (Median: m18 = „Grenzfall allergischer Erkrankung“; m30 = „nur leicht krank“).

4.2.2 Änderungen humoraler Mediatoren während saisonaler Birkenpollenexposition

Im Vergleich der außerhalb der Pollenflugzeit ermittelten Serumkonzentrationen BPA- und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörper mit Werten zu Zeiten saisonaler Allergenexposition konnten keine signifikanten Veränderungen innerhalb beider Gruppen allergischer Patienten festgestellt werden (Abb. 32). In den gesunden Probanden (Nicht-Allergiker) waren dagegen keine spezifischen IgE-Antikörper zu detektieren.

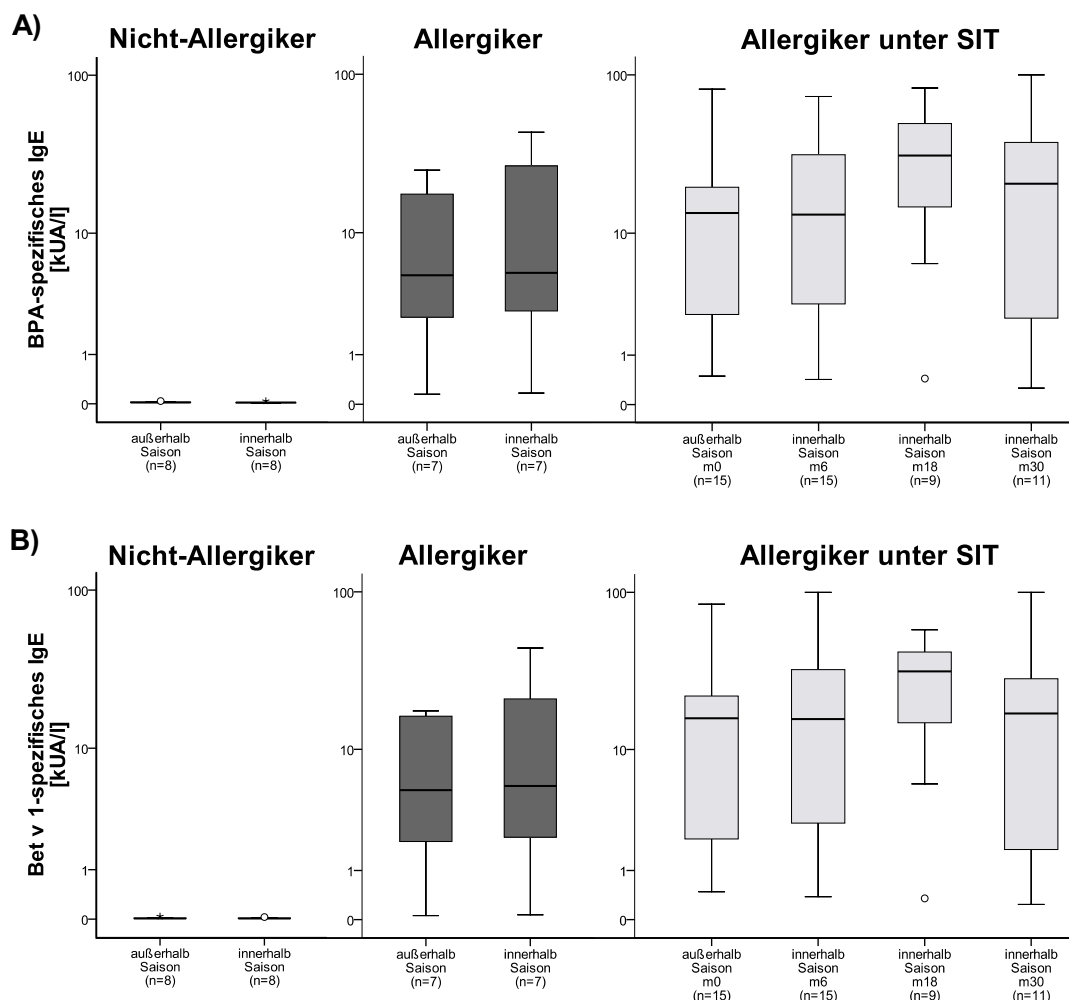


Abb. 32: Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf spezifische IgE-Antikörperkonzentrationen. Abgebildet sind die Konzentrationen Birkenpollenallergen (BPA)- (A) und Bet v 1-spezifischer IgE-Antikörper (B) außerhalb der Pollenflugzeiten im Vergleich zu innerhalb der Birkenpollensaison ermittelten Antikörperkonzentrationen in den Seren von Nicht-Allergikern (gesunde Probanden), symptomatisch behandelten Patienten sowie Allergikern unter spezifischer Immuntherapie (SIT).

Bei der Analyse allergenspezifischer IgG4-Antikörper konnten keine substantiellen Konzentrationen in gesunden Probanden und unbehandelten Birkenpollenallergikern sowohl innerhalb der Birkenpollensaison als auch außerhalb der Pollenflugzeiten festgestellt werden (Abb. 33). Darüber hinaus wurden weder bedeutsame Konzentrationen an Bet v 1-spezifischen

IgA- noch IgG-Antikörpern in den Seren dieser beiden Kontrollpopulationen detektiert (Daten nicht gezeigt). Deutlich ist jedoch der signifikante, sukzessive Anstieg spezifischer IgG4-Antikörper in den drei aufeinander folgenden Birkenpollenflugzeiten (m6, m18 und m30) in der Gruppe SIT-behandelter Allergiker (Abb. 33).

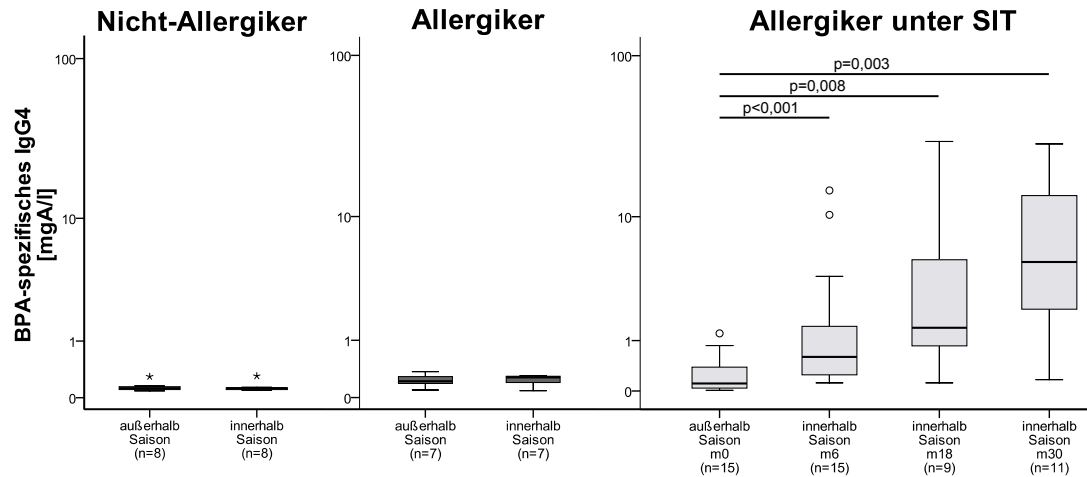


Abb. 33: Die Auswirkung saisonaler Pollenexposition auf Birkenpollenallergen (BPA)-spezifische IgG4-Antikörperkonzentrationen. Die IgG4-Serumkonzentrationen nicht-allergischer Probanden und ausschließlich symptomatisch therapiert Allergiker zeigten keine durch natürlichen Birkenpollenflug induzierten Unterschiede im Vergleich zu den außerhalb der Pollensaison ermittelten Ausgangswerten. Bei den Patienten unter spezifischer Immuntherapie (SIT) war dagegen eine stetige Zunahme spezifischer IgG4-Antikörper innerhalb der drei nachfolgenden Birkenpollensaisons (m6, m18 und m30) zu verzeichnen. Statistisch signifikante Veränderungen ($p<0,05$) in Relation zum Ausgangswert außerhalb der Birkenpollenflugzeit wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Hinsichtlich des Quotienten BPA-spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper während saisonaler Birkenpollenexposition fand sich lediglich bei den Allergikern unter SIT eine signifikante und fortdauernde Abnahme über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 34). Das IgE/IgG4-Verhältnis der nicht mit einer SIT behandelten Patienten blieb auch während natürlicher Allergenexposition auf einem unveränderten, konstant erhöhten Niveau. Die in den drei Gruppen ermittelten Ergebnisse allergenspezifischer Antikörperkonzentrationen weisen darauf hin, dass der ausschließlich in den SIT-behandelten Patienten detektierte Anstieg spezifischer IgG4-Antikörper auf die Therapie zurückzuführen ist und nicht durch eine erhöhte Allergenexposition während der Birkenpollensaison hervorgerufen wurde.

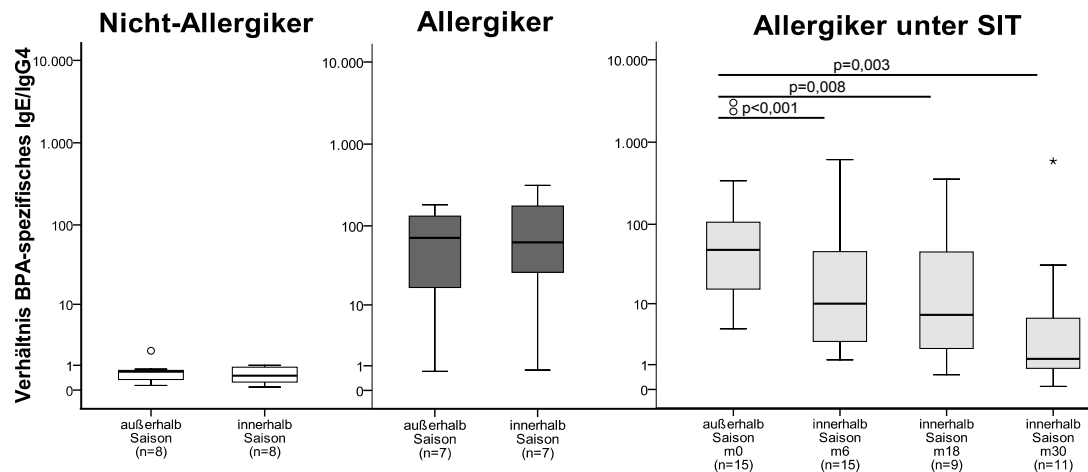


Abb. 34: Die Veränderungen im Verhältnis Birkenpollenallergen (BPA)- spezifischer IgG4- zu IgE-Antikörperkonzentrationen unter natürlicher Allergenexposition. Bei Nicht-Allergikern und Birkenpollenallergikern, die keine spezifische Immuntherapie (SIT) erhielten, blieben die außerhalb der Birkenpollensaison ermittelten IgE/IgG4-Quotienten gegenüber Zeiten saisonalen Pollenflugs konstant. Eine fortschreitende Reduktion des Verhältnisses spezifischer IgE- zu IgG4-Antikörper konnte dagegen über den dreijährigen Verlauf der SIT festgestellt werden. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert außerhalb der Birkenpollenflugzeit wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

4.2.3 Frequenzanalyse Bet v 1-spezifischer T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen unter natürlicher Allergenexposition

Wie in den Kap. 4.1.3 und 4.1.4 beschrieben, reagierten die mit einer SIT behandelten Birkenpollenallergiker auf die natürliche Allergenexposition zum Zeitpunkt der ersten Birkenpollenflugsaison nach Therapiebeginn mit einem signifikanten Anstieg Bet v 1-spezifischer Th2- und Tr1-Zellen. Zudem lag eine tendenzielle Erhöhung allergenspezifischer Th1-Zellen vor. Analog der Bestimmung Bet v 1-spezifischer T-Zellen bei hyposensibilisierten Allergikern wurden die Frequenzen der drei unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen mit Hilfe des ELISPOT-Verfahrens bei den zwei Kontrollgruppen ermittelt. Die Betrachtung der Th2-Zellpopulation ergab einen Anstieg Bet v 1-spezifischer, IL-5-produzierender Zellen während der Birkenpollensaison bei den Allergikern. Sowohl bei den ausschließlich symptomatisch behandelten Patienten ($p = 0,046$) als auch in der ersten Birkenpollensaison bei den Allergikern unter SIT (m6; $p = 0,025$) fand sich eine entsprechende Erhöhung der allergenspezifischen Th2-Zellen (Abb. 35). Diese Zunahme war jedoch in den beiden folgenden Pollenflugzeiten (m18 und m30) nicht mehr zu detektieren. Die Frequenz der Th2-Zellpopulation blieb in der zweiten und dritten Birkenpollensaison zudem unter der Anzahl IL-5-produzierender Zellen vor Beginn der Therapie (Median (mit Spannweite): m0 = 28 (0-94); m6 = 79 (6-140); m18 = 16 (1-93); m30 = 20 (0-69) IL-5⁺ Zellen pro 2×10^5 PBMC). Innerhalb der Gruppe gesunder Kontrollprobanden war keine signifikante Erhöhung allergenspezifischer Th2-Zellen zu verzeichnen.

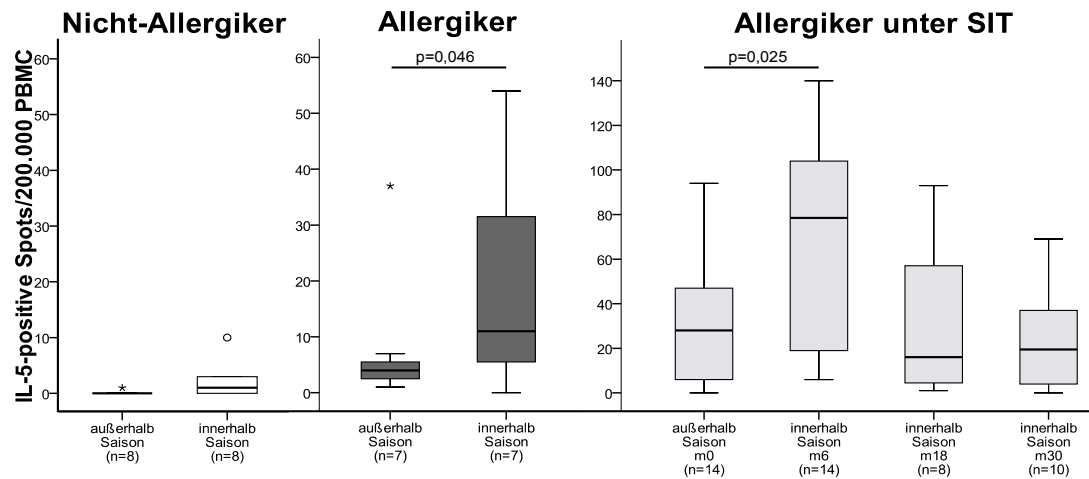


Abb. 35: Die saisonalen Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 2-Zellen. Dargestellt sind die durch natürliche Allergenexposition hervorgerufenen Unterschiede in der Frequenz Bet v 1-spezifischer, Interleukin (IL)-5-produzierender Zellen für gesunde Kontrollen (Nicht-Allergiker) und ausschließlich symptomatisch behandelte Birkenpollenallergiker im Vergleich zu Patienten mit spezifischer Immuntherapie (SIT). Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-5⁺ spots pro 2x10⁵ PBMC dar. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert außerhalb der Birkenpollenflugzeit wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

Im Gegensatz zu den Th2-Zellen wiesen alle drei untersuchten Probandenkollektive keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich der Anzahl IFN γ -produzierender Th1-Zellen zwischen außerhalb der Pollenflugzeit gelegenen und saisonalen Zeitpunkten auf (Abb. 36).

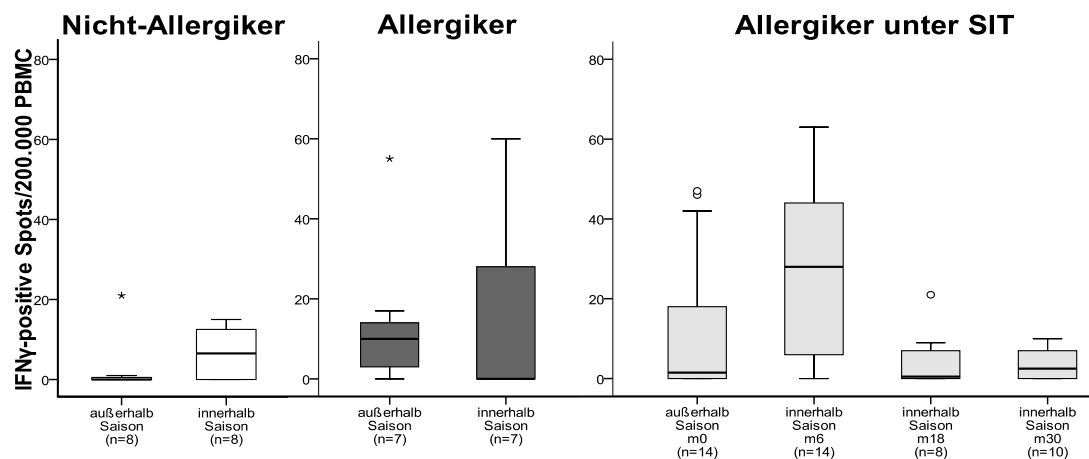


Abb. 36: Die durch saisonale Allergenexposition induzierten Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th) 1-Zellen. Abgebildet sind die auf saisonale Unterschiede im Pollenflug zurückzuführenden Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer, Interferon (IFN) γ -produzierender Zellen für gesunde Kontrollen (Nicht-Allergiker) und ausschließlich symptomatisch behandelte Birkenpollenallergiker im Vergleich zu den Werten von Patienten unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IFN γ ⁺ spots pro 2x10⁵ PBMC dar.

Allerdings erhöhte sich die Frequenz Bet v 1-spezifischer, IFN γ -sezernierender Zellen tendenziell während der Phase der natürlichen Allergenexposition in der Gruppe gesunder

Probanden sowie bei den Patienten unter SIT in der ersten Pollensaison nach Beginn der Behandlung. Wie zuvor war der Anstieg allergenspezifischer Zellen nur innerhalb der ersten Pollenflugzeit (m6) unter SIT festzustellen. In den darauf folgenden Phasen saisonaler Birkenpollenexposition (m18 und m30) konnte keine Zunahme IFN γ -produzierender Th1-Zellen in der Gruppe SIT-behandelter Probanden mehr detektiert werden.

4.2.4 Frequenzanalyse induzierbarer, Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T-Zellen unter natürlicher Allergenexposition

Aufgrund des klinischen Einflusses allergenspezifischer Tr1-Zellen und des assoziierten Markerzytokins IL-10 bei der Suppression allergischer Immunreaktionen (vgl. Kap. 1.7.2.2) wurde der Bestimmung dieser T-Zellpopulation eine wesentliche Bedeutung beigemessen. Eine Induktion Bet v 1-spezifischer, IL-10⁺ T-Zellen durch saisonalen Pollenflug konnte innerhalb der Gruppe gesunder Probanden und symptomatisch behandelter Birkenpollenallergiker nicht nachgewiesen werden (Abb. 37). Eine signifikante Erhöhung allergenspezifischer, IL-10-sezernierender Zellen war lediglich innerhalb der ersten Birkenpollensaison (m6) nach Behandlungsbeginn zu detektieren. Im anschließenden Verlauf der SIT konnte dagegen kein weiterer Tr1-Zellanstieg zu Zeitpunkten natürlicher Allergenexposition (m18 und m30) ermittelt werden.

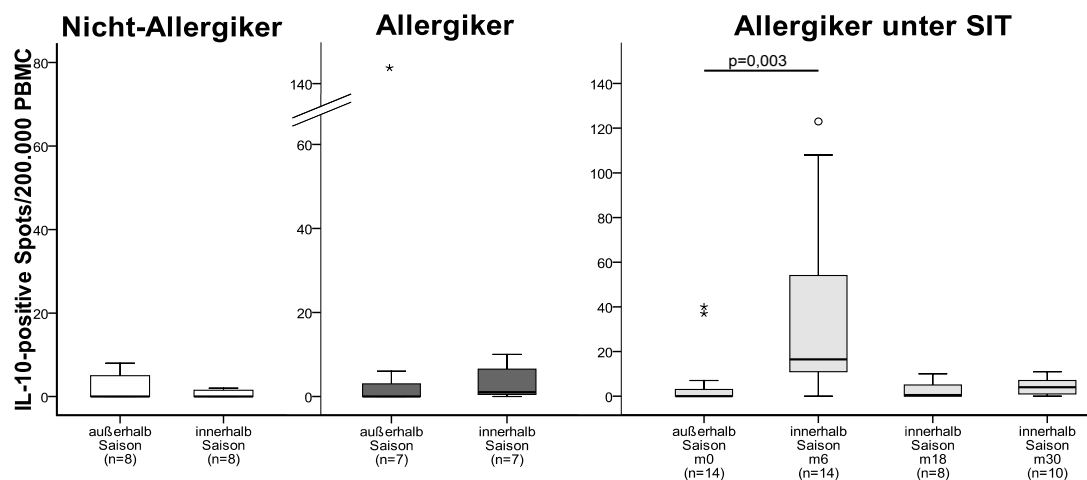


Abb. 37: Die Auswirkung natürlicher Allergenexposition auf die Frequenz Bet v 1-spezifischer Typ-1-regulatorischer T (Tr1)-Zellen. Vergleichend dargestellt sind die durch natürliche Allergenexposition bzw. spezifische Immuntherapie (SIT) induzierten Veränderungen in der Frequenz Bet v 1-spezifischer, Interleukin (IL)-10-produzierender Zellen für gesunde Kontrollen (Nicht-Allergiker), ausschließlich symptomatisch behandelte Birkenpollenallergiker und hyposensibilisierte Patienten. Die mit dem ELISPOT-Verfahren ermittelten Werte stellen die Anzahl IL-10⁺ spots pro 2x10⁵ PBMC dar. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert außerhalb der Birkenpollenflugzeit wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

In Bezug auf die vorliegenden Daten lässt der erhebliche Anstieg Bet v 1-spezifischer Tr1-Zellen ausschließlich in den SIT-behandelten Patienten in Verbindung mit der klinischen Verbesserung und den abgeschwächten allergischen Symptomen während der ersten

Pollensaison nach Behandlungsbeginn eine direkte Wechselbeziehung zwischen der Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen und der Entwicklung einer klinischen Allergentoleranz vermuten.

4.2.5 Proportionale Veränderungen der einzelnen T-Zellsubpopulationen während saisonaler Allergenexposition

Bei der Bestimmung des Verhältnisses zwischen Bet v 1-spezifischen Th2- und Th1-Zellen zeigten sich im Gegensatz zu den gesunden Probanden bei den Patienten unter SIT sowie den Birkenpollenallergikern ohne Hyposensibilisierung eher Th2-dominierte Immunantworten. Eine auf natürliche Birkenpollenexposition zurückzuführende signifikante Veränderung des Th2/Th1-Quotienten war allerdings nicht zu beobachten (Abb. 38). Jedoch konnte einerseits bei den symptomatisch therapierten Allergikern eine tendenzielle Zunahme, andererseits bei den nicht-allergischen Probanden die Tendenz eines reduzierten Th2/Th1-Zellverhältnisses innerhalb der Pollenflugzeit detektiert werden. Eine ähnliche Veränderung war bei den spezifisch therapierten Patienten über den Verlauf der SIT nicht zu erkennen. In diesem Kollektiv blieb das Verhältnis der zwei T-Zellsubpopulationen zueinander in den drei untersuchten Pollenflugzeiten nach Behandlungsbeginn auf einem relativ konstanten Niveau, wobei eine eher Th2-polarisierte Immunantwort aufrecht erhalten blieb.

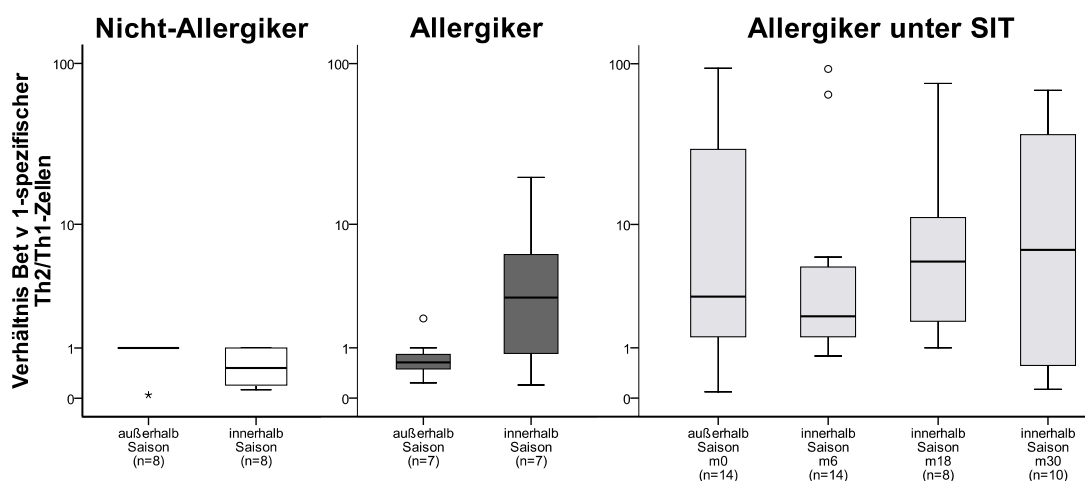


Abb. 38: Der Einfluss natürlicher Allergenexposition auf das Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th)2- zu Th1-Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis allergenspezifischer Interleukin-5- (Th2-) zu Interferon γ -produzierenden (Th1-) Zellen außerhalb und innerhalb der Birkenpollenflugzeiten in nicht-allergischen Probanden und Birkenpollenallergikern ohne Hyposensibilisierung im Vergleich zu Patienten unter spezifischer Immuntherapie (SIT). Signifikante Unterschiede waren innerhalb der drei untersuchten Kollektive nicht zu detektieren, doch fand sich in Nicht-Allergikern eine eher Th1-polarisierte, in Patienten ohne SIT ein Th2-dominierte allergenspezifische T-Zellantwort.

Im Gegensatz dazu konnte ein SIT-vermittelter Einfluss auf das Th2/Tr1-Zellverhältnis festgestellt werden. Bei hyposensibilisierten Patienten wurde eine signifikante Reduktion nach sechsmonatiger Therapie detektiert (m6; $p=0,022$; Abb. 39). Dieser Quotient blieb auch in den beiden folgenden Birkenpollensaisons (m18 und m30) im Vergleich zu den zu Behandlungsbeginn ermittelten Ausgangswerten substantiell vermindert. Indessen konnten in den beiden anderen Patientenkollektiven keine Veränderungen nachgewiesen werden.

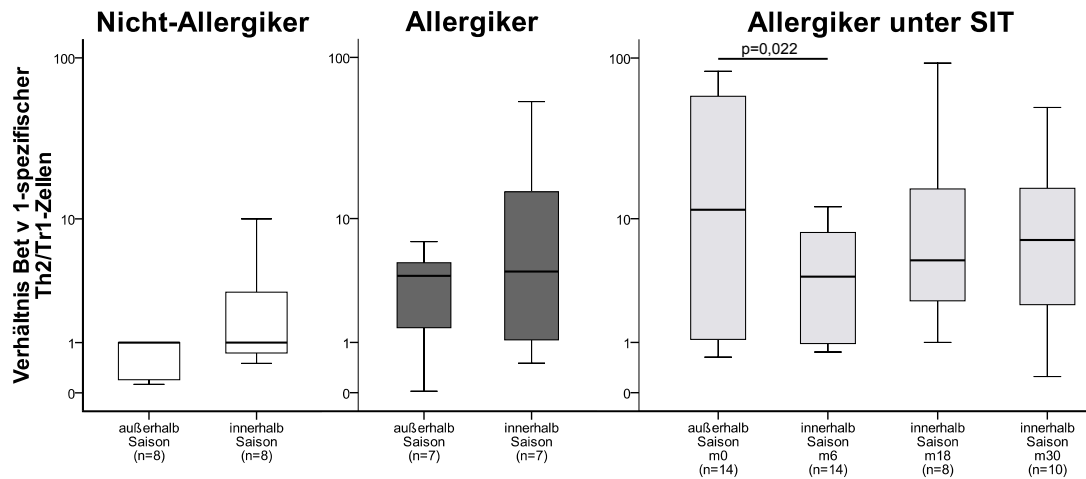


Abb. 39: Die Auswirkung saisonaler Allergenexposition auf das Verhältnis Bet v 1-spezifischer T-Helfer (Th)2- zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen. Eine signifikante Veränderung des Th2/Tr1-Zellverhältnisses im Vergleich außerhalb zu innerhalb saisonaler Birkenpollenexposition ermittelter Werte konnte ausschließlich in Birkenpollenallergikern nach sechsmonatiger (m6) Behandlung mit spezifischer Immuntherapie (SIT) nachgewiesen werden. Der Th2/Tr1-Quotient blieb dabei auch während der nachfolgenden Pollenflugzeiten (m18 und m30) im Vergleich zum Therapiebeginn reduziert. Statistisch signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) in Relation zum Ausgangswert außerhalb der Birkenpollenflugzeit wurden anhand des zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt.

4.2.6 Frequenzanalyse $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T-Zellen unter natürlicher Allergenexposition

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Frequenz $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen ergab bei den gesunden Probanden keine auf saisonalen Birkenpollenflug zurückzuführende Unterschiede (Abb. 40).

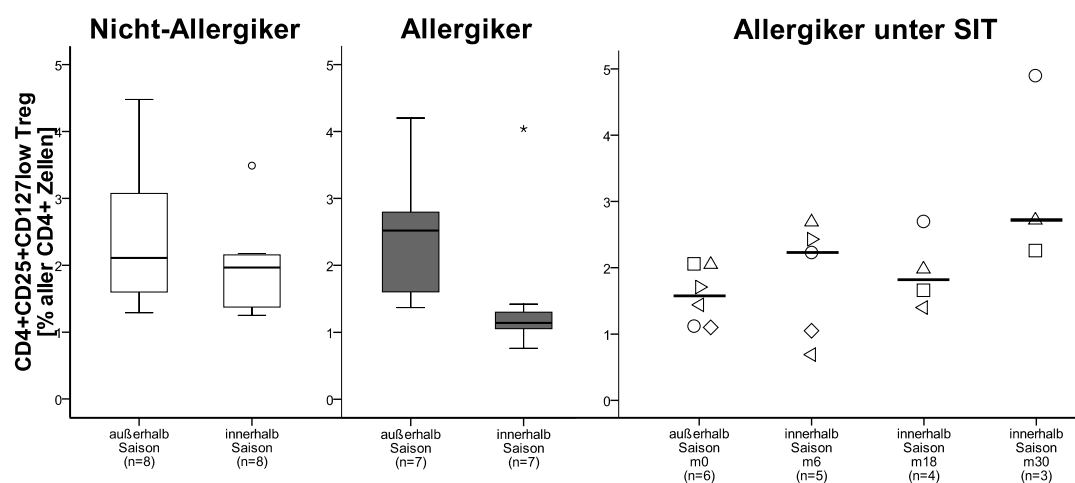


Abb. 40: Der Einfluss saisonaler Allergenexposition auf die Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T (Treg)-Zellen. Signifikante, durch saisonalen Pollenflug induzierte Veränderungen in der Frequenz $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen konnten in den drei untersuchten Probandengruppen nicht detektiert werden. Allerdings fand sich eine Reduktion $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen innerhalb der Birkenpollensaison bei symptomatisch behandelten Allergikern, wohingegen eine Tendenz zu erhöhten Frequenzen $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen bei Patienten im Verlauf der spezifischen Immuntherapie (SIT) vorlag. Die Treg-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie als $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Zellen innerhalb der Population aller $CD4^+$ peripheren Blutlymphozyten quantifiziert.

Dagegen fand sich in der Gruppe nicht-spezifisch immuntherapierter Birkenpollenallergiker eine Verringerung der Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen in Bezug zur Gesamtmenge an $CD4^+$ Zellen unter natürlicher Allergenexposition. Interessanterweise nahm dagegen der Prozentsatz an Treg-Zellen in den hyposensibilisierten Patienten im Verlauf der SIT innerhalb der Pollensaison im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Therapie tendenziell zu. Aufgrund der geringen Fallzahl kann jedoch nur vermutet werden, dass es sich dabei tatsächlich um einen SIT-induzierten Effekt handelt.

5 Diskussion

Die vorliegende Studie stellt eine detaillierte longitudinale Analyse der unter SIT induzierten Immunmodulationen auf humoraler und zellulärer Ebene bei Patienten mit Birkenpollenallergie dar. Der klinische Behandlungsverlauf wurde mittels allergologischer Testverfahren sowie der Erhebung von Beschwerde- und Medikamentenscores beurteilt. Parallel erfolgte die Bestimmung der Serumkonzentrationen allergenspezifischer Antikörper sowie der Frequenzen allergenspezifischer Th- und Treg-Zellpopulationen während der Einleitungs- und der Erhaltungsphase. Ein weiterer Schwerpunkt war der Vergleich immunologischer Parameter, die während natürlicher Allergenexposition erhoben wurden, mit den außerhalb der Pollensaison aufgenommenen Werten. Diese Untersuchungen sowie vergleichende Analysen mit ausschließlich symptomatisch therapierten Birkenpollenallergikern und gesunden Probanden ohne Manifestation einer IgE-vermittelten Allergie ermöglichten es, SIT-induzierte (therapeutische Allergenexposition) von durch Pollenflug (natürliche Allergenexposition) verursachten Veränderungen in den Patienten zu unterscheiden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Induktion einer immunologischen Allergentoleranz und deren Aufrechterhaltung auf einem multifaktoriellen Zusammenspiel zellulärer und humoraler Immunparameter mit unterschiedlicher Gewichtung basieren. Bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten fand sich bereits nach sechsmonatiger SIT zu Zeiten saisonalen Pollenflugs eine signifikante klinische Verbesserung der allergischen Beschwerden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten blieb. Im Gegensatz dazu konnte in der entsprechenden Kontrollgruppe durch symptomatische Medikation keine Reduktion der allergischen Reaktionsfähigkeit erreicht werden. Die humorale Immunantwort hyposensibilisierter Patienten war durch kontinuierlich zunehmende Serumkonzentrationen allergenspezifischer IgG4-Antikörper charakterisiert. Eine ähnliche Induktion konnte in den Kontrollpopulationen nicht beobachtet werden. Dagegen zeigten allergenspezifische IgE- und IgA-Antikörper aller drei Probandengruppen weder SIT-induzierte noch durch natürliche Allergenexposition hervorgerufene Unterschiede. Auf zellulärer Ebene führte einzig die SIT zu einem deutlichen, jedoch transienten Anstieg supprimierender, Bet v 1-spezifischer Tr1-Zellen. Neben der Verschiebung des Verhältnisses an Th-Zellen zu Gunsten einer Th1-medierten Immunantwort zum Ende des ersten Behandlungsjahres konnte zudem im weiteren Verlauf der SIT der für die Birkenpollenallergiker charakteristische saisonale Anstieg allergieassoziiierter Th2-Zellen nicht mehr detektiert werden. Signifikante Änderungen in der Frequenz $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen wurden dagegen in keinem der drei Kollektive nachgewiesen. Die vorliegenden Daten spiegeln somit eine ausgeprägte zeitliche Dynamik im Rahmen der SIT-induzierten Allergentoleranz wider.

5.1 Einfluss spezifischer Immuntherapie auf immunologische Mechanismen bei Typ-I-Allergien

Im Gegensatz zu symptomatischen Behandlungsformen wie Allergenkenz oder Pharmakotherapien stellt die SIT die einzige Möglichkeit dar, den Krankheitsverlauf von

Patienten mit einer Soforttypallergie dauerhaft zu verändern (Bodtger et al., 2002; Grammer et al., 1982; Jutel et al., 2005; Passalacqua und Canonica, 2002; Walker et al., 1995) und neue Sensibilisierungen (Calderon et al., 2007; Des Roches et al., 1997; Pajno et al., 2001; Purello-D'Ambrosio et al., 2001) sowie den Etagenwechsel der atopischen Erkrankung von einer RCA zum Asthma bronchiale zu verhindern (Jacobsen et al., 2007; Kleine-Tebbe et al., 2009; Moller et al., 2002; Niggemann et al., 2006; Novembre et al., 2004; Polosa et al., 2005). So zeigten Patienten mit RCA selbst zehn Jahre nach Initiation der SIT ein geringeres Risiko, ein Asthma bronchiale zu entwickeln, als unbehandelte Allergiker (Jacobsen et al., 2007). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die klinische Wirksamkeit der SIT nach Beendigung der Therapie für mehrere Jahre erhalten bleibt (Durham et al., 1999a; Jacobsen et al., 2007; Jacobsen et al., 1997). Demzufolge wird die SIT als die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit von Allergien angesehen.

Nachteile der SIT sind die lange Behandlungsdauer und das potentielle Auftreten systemischer, anaphylaktischer Reaktionen (Williams et al., 2004), die auch als wesentliche Gründe für den vorzeitigen Abbruch der Therapie erachtet werden. In der Regel zeigen die meisten klinischen SIT-Studien eine Verordnungstreue (*compliance*) von weniger als 70% und sogar Raten unter 50% stellen keine Seltenheit dar (Senna et al., 2009). Im Rahmen dieser Studie vollendeten 73,3% der Patienten (11/15) die ersten 30 Monate der SIT, wobei Therapieabbrüche mit Umzug, Operation bzw. Schwangerschaft begründet wurden und somit nicht auf Nebenwirkungen oder zeitliche Belastungen zurückzuführen waren.

5.1.1 Veränderung der klinischen Symptomatik unter spezifischer Immuntherapie

Bei allen Patienten fand sich bereits nach sechs Monaten Behandlungsdauer zum Zeitpunkt saisonaler Allergenexposition eine ausgeprägte Verbesserung der klinischen Beschwerden (Symptomscore), die nach einjähriger SIT auch mit den objektiv erhobenen Parametern (Pricktest, Rhinomanometrie) nachgewiesen werden konnte. Das gute klinische Ansprechen der Birkenpollenallergiker auf die SIT blieb daraufhin über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den vor Therapiebeginn ermittelten Werten erhalten. Die Auswertung der klinischen Untersuchungsparameter (Pricktest, Rhinomanometrie) nach einem Jahr ergab zudem eine deutliche Abnahme der Reaktionsstärke auf BPA. So war bereits zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Reduktion der Hautreaktivität gegen BPA in über 80% der Patienten zu verzeichnen, welche über den dreijährigen Behandlungsverlauf weiter abnahm. Diese Daten liegen somit im Bereich kontrollierter Doppelblindstudien an hyposensibilisierten RCA-Patienten (Drachenberg et al., 2001; Mirone et al., 2004; Varney et al., 1991; Walker et al., 1995). Die Verminderung der klinischen Symptome während natürlicher Allergenexposition geht hierbei eindeutig auf SIT-induzierte Veränderungen zurück, da in der ausschließlich symptomatisch therapierten Kontrollgruppe keine Abnahme im Schweregrad der allergischen Erkrankung in zwei aufeinander folgenden Birkenpollensaisons festgestellt werden konnte. Die vollständige Linderung der allergischen Symptome, insbesondere zu Pollenflugzeiten mit sehr starker Allergenbelastung, wird jedoch nicht immer in allen SIT-behandelten Patienten erreicht. In einigen Studien wird daher zusätzlich die Anwendung symptomatischer Medikation als ein

weiterer Parameter für die klinische Effektivität der SIT mit einbezogen. Generell ist dabei auch in Zeiten hoher natürlicher Allergenexposition eine signifikante Abnahme des Medikamentenverbrauchs unter SIT zu verzeichnen (Ferrer et al., 2005; Frew et al., 2006; Varney et al., 1991; Walker et al., 1995). Das in dieser Studie beobachtete Ausbleiben signifikanter Veränderungen in der Arzneimittelanwendung unter SIT ist wahrscheinlich auf das Fehlen eines Korrekturfaktors zurückzuführen (Canonica et al., 2007). Dementsprechend könnte möglicherweise eine gewichtete Beurteilung der Wirksamkeit der unter SIT angewendeten Medikation (Antihistaminika, Bronchodilatoren oder Kortikosteroide) bzw. der Anwendungsdosis sowie -häufigkeit während natürlicher Allergenexposition zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Literatur berichtet, d.h. einer Abnahme des Medikamentenverbrauchs im Verlauf der SIT, führen.

5.1.2 Modulation der Antikörperantwort durch spezifische Immuntherapie

Eine Hypothese zur Wirksamkeit der SIT beruht auf der Annahme, dass niedrige Mengen an Allergen, entsprechend solchen unter natürlicher Allergenexposition, zur Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper führen, während höhere Allergendosen die Entwicklung einer protektiven Antikörperantwort induzieren können (Blaser, 1996). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurden mögliche Veränderungen birkenpollenspezifischer IgE-, IgG- und IgA-Antikörper im Behandlungsverlauf der SIT überprüft.

Die Datenlage zum Verlauf allergenspezifischer IgE-Antikörper unter SIT erscheint dabei sehr divergierend. Studien beschreiben zum einen die substantielle Zunahme von IgE-Serumkonzentrationen während der Therapie (Antunez et al., 2008; Gafvelin et al., 2005; Muller et al., 1998), andererseits einen kontinuierlichen Rückgang allergenspezifischer IgE-Antikörper, gelegentlich nach initial transientem Anstieg (Fennerty et al., 1988; Jutel et al., 2005; Van Ree et al., 1997). Darüber hinaus wurden lediglich marginale Veränderungen bzw. nahezu unbeeinflusste Konzentrationen spezifischer IgE-Antikörper unter SIT beobachtet (Gehlhäuser et al., 1999; Pilette et al., 2007). Bei den im Kap. 4.1.2 beschriebenen Ergebnissen ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration allergenspezifischer IgE-Antikörper im Verlauf der SIT nachweisen. Zudem konnte in den hyposensibilisierten Patienten mit saisonalem Anstieg der IgE-Konzentration die von einigen Autoren mit dem Erfolg einer SIT in Verbindung gebrachte, reduzierte Erhöhung allergenspezifischer IgE-Antikörper während natürlicher Allergenexposition nicht festgestellt werden (Mothes und Valenta, 2004; Niederberger et al., 2004). Obwohl eindeutig belegt ist, dass IgE-Antikörper die Schlüsselmoleküle der allergischen Soforttypreaktion sind (Ishizaka et al., 1966b; Johansson und Bennich, 1967), fand sich in den SIT-behandelten Patienten keine klare Wechselbeziehung zwischen birkenpollenspezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen und der klinischen Symptomatik. Die Besserung klinischer Beschwerden und folglich auch die Effektivität der SIT hingen somit nicht von der Reduktion allergenspezifischer IgE-Antikörper ab. Langlebige Plasmazellen könnten ein Grund für die in dieser Studie anhaltende IgE-Antikörperproduktion nach dreijähriger SIT sein. Diese Zellen stellen eine unabhängige Komponente des immunologischen Gedächtnisses dar und sind in der Lage, in entsprechenden

„Überlebensnischen“ die allergenspezifische IgE-Antikörperproduktion aufrechtzuerhalten und demzufolge durch andauernde Sekretion konstante Antikörperkonzentrationen zu gewährleisten (Hiepe und Dörner, 2005; Radbruch et al., 2006). Bei den vorliegenden Unterschieden im Rahmen der Bestimmung allergenspezifischer IgE-Antikörper lässt sich lediglich über potentielle Ursachen spekulieren. Doch scheint die Diskrepanz nicht auf Therapieform oder appliziertem Allergenpräparat, sondern vielmehr auf methodischen Aspekten sowie den gewählten Abnahmezeitpunkten der Serumproben zu beruhen.

Im Gegensatz zur IgE-Antikörperantwort konnten in dieser Studie durch die SIT induzierte Veränderungen in der Konzentration allergenspezifischer IgG-Antikörper nachgewiesen werden. So zeigte sich bereits am Ende der Aufdosierungsphase eine signifikante Erhöhung sowohl des Gesamtspiegels allergenspezifischer IgG-Antikörper als auch der Serumkonzentrationen des IgG4-Isotyps. Für die IgG4-Subklasse wurde zudem ein kontinuierlicher Anstieg über den Verlauf der SIT festgestellt. Die in dieser Studie detektierte Zunahme allergenspezifischer IgG- und IgG4-Antikörper konnte in einer Vielzahl von Studien belegt werden (Antunez et al., 2008; Gehlhar et al., 1999; Jutel et al., 2003; Pilette et al., 2007; Wachholz et al., 2003). Ein durch natürliche Allergenexposition verursachter Anstieg in der Konzentration allergenspezifischer IgG-Antikörper war dagegen nicht zu beobachten. Weder eine Zunahme spezifischer IgG- noch IgG4-Antikörper konnte in gesunden Probanden sowie in symptomatisch behandelten Allergikern während der Pollenflugsaison detektiert werden.

Hinsichtlich funktioneller Eigenschaften besteht überwiegend der Konsens, dass allergenspezifische IgG-Antikörper in der Peripherie als blockierende Antikörper eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Toleranz und der Reduktion allergischer Entzündungsreaktionen spielen. Lessof et al. demonstrierten *in vivo* die protektive Wirksamkeit von IgG-Antikörpern, indem sie Bienengiftallergikern aus Plasma von Bienenzüchtern gewonnene Immunglobuline applizierten. Diese Behandlung führte dazu, dass allergische Reaktionen erst durch wesentlich höhere Allergendosen auszulösen waren (Lessof et al., 1978). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass spezifische IgG-Antikörper das Allergen abfangen, bevor es in der Lage ist, Effektorzell-gebundene IgE-Antikörper zu binden und eine Aktivierung von Mastzellen und Basophilen zu erreichen (Ejrnæs et al., 2006). Die Blockadefunktion der IgG-Antikörper trägt somit dazu bei, die allergenspezifische, IgE-vermittelte Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch Mastzellen und Basophile zu verhindern (Möthes und Valenta, 2004; Shim et al., 2003) sowie die unterstützende Wirkung von IgE-Antikörpern bei der Allergenpräsentation für T-Zellen zu unterbinden (Flicker und Valenta, 2003; Wachholz und Durham, 2004). Die daraus resultierende direkte Konkurrenz zwischen den Antikörpern um die Bindung des Allergens unterstreicht die blockierende Funktion der IgG-Antikörper.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit potentielle Veränderungen der allergenspezifischen IgG-Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 nicht untersucht wurden, spricht die deutlich höhere Konzentration an allergenspezifischen IgG-Antikörpern im Vergleich zum IgG4-Isotyp für einen zusätzlichen Anstieg zumindest einer weiteren IgG-Subklasse. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass in SIT-behandelten Patienten neben IgG4-Antikörpern

auch allergenspezifische IgG1- und in geringerem Umfang IgG2-Antikörper induziert werden (Jutel et al., 2005; Mothes und Valenta, 2004; Niederberger et al., 2004). Gegenwärtig wird jedoch kontrovers diskutiert, in welchem Ausmaß die verschiedenen Subklassen zur protektiven Wirkung allergenspezifischer, SIT-induzierter IgG-Antikörper beitragen.

Es ist bekannt, dass für die Induktion unterschiedlicher IgG-Subklassenantworten die Struktur des Antigens sowie die Dauer der Antigenexposition entscheidend sind. So lösen bspw. bakterielle Polysaccharidantigene größtenteils IgG2-gewichtete humorale Antworten aus, während die im Rahmen einer SIT gegen Allergene induzierte Antikörperantwort hauptsächlich der IgG4-Subklasse zugeordnet werden kann (Aalberse et al., 2009). Da darüber hinaus in funktionellen Experimenten IgG4-depletierte Seren die Bindung von Allergen/IgE-Komplexen an B-Zellen nicht im gleichen Ausmaß inhibierten wie isolierte IgG4-Fraktionen oder Gesamt-IgG enthaltende Seren von Patienten nach erfolgreicher SIT (Pilette et al., 2007), wird die blockierende Aktivität hauptsächlich der IgG4-Subklasse zugeschrieben. Zwar konnte hiermit experimentell gezeigt werden, dass die Antikörper des IgG4-Isotyps mit IgE-Antikörpern um die Bindung der Allergene konkurrieren, doch fand sich in einigen Allergikern trotz hoher Anstiege in der IgG-Produktion unter SIT, insbesondere der IgG4-Subklasse, keine Korrelation mit der Verbesserung der allergischen Erkrankung (Birkner et al., 1990; Bodtger et al., 2005). Andere Autoren folgerten daraus, dass die blockierende Aktivität eher auf der Epitopspezifität als auf einem bestimmten IgG-Isotyp beruht. Visco et al. zeigten diesbezüglich, dass allergenspezifische monoklonale IgG1-Antikörper in der Lage waren, die Bindung zwischen Bet v 1 und IgE-Antikörpern zu inhibieren, wohingegen monoklonale IgG4-Antikörper, die mit einem anderen Epitop reagierten, die IgE-Bindung sogar förderten (Visco et al., 1996).

Noch nicht eindeutig geklärt ist, ob der Erfolg einer SIT nur auf der erhöhten Quantität oder auch auf einer Zunahme der blockierenden Aktivität der IgG-Antikörper beruht (Ejrnaes et al., 2006; Jutel et al., 2006). Da kürzlich gezeigt wurde, dass die SIT keine Veränderungen in der Bindungsfähigkeit von IgG-Antikörpern verursacht (Bodtger et al., 2005; Ejrnaes et al., 2006), kann der blockierende Effekt der IgG-Antikörper vermutlich im Wesentlichen durch ihre quantitative Zunahme begründet werden. Ein aussagekräftiger Parameter der Toleranzinduktion auf humoraler Ebene erscheint damit durch den Quotienten aus allergenspezifischen IgE- zu IgG- bzw. IgG4-Antikörpern gegeben (Antunez et al., 2008; Keskin et al., 2006; van Neerven et al., 1999). So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine fortwährende signifikante Abnahme des IgE/IgG4-Verhältnisses im Verlauf der dreijährigen SIT, die mit der klinischen Besserung der Patienten korrelierte. Darüber hinaus fand sich in Studien, die parallel zu erhöhten IgG-Konzentrationen einen Anstieg spezifischer IgE-Antikörper unter SIT detektierten, eine Abnahme des IgE/IgG- bzw. IgE/IgG4-Quotienten (Akdis et al., 1996; Antunez et al., 2008; Muller et al., 1998).

Die Ergebnisse allergenspezifischer IgA-Antikörperantworten ergaben in dieser Studie ähnlich den IgE-Serumkonzentrationen keine Veränderungen unter SIT. Das Ausbleiben SIT-induzierter Unterschiede im Verlauf einer Therapie wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Gafvelin et al., 2005; Niederberger et al., 2004), allerdings wurden auch erhöhte Werte allergenspezifischer IgA-Antikörper im Behandlungsverlauf ermittelt (Jutel et al., 2003; Pilette et

al., 2007). Bei asthmatischen Kindern unter SIT fand sich dagegen ein Anstieg allergenspezifischer IgA-Antikörper auf das Niveau gesunder Probanden (Bahceciler et al., 2005).

Erhöhte IgA-Serumkonzentrationen werden darüber hinaus als charakteristische Immunantwort gesunder Individuen angesehen (Jutel et al., 2003). Da sich analog den SIT-therapierten Patienten in Nicht-Allergikern lediglich sehr geringe IgA-Konzentrationen feststellen ließen, konnte diese Beobachtung durch die vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Die geringen Serumkonzentrationen allergenspezifischer IgA-Antikörper können darauf zurückgeführt werden, dass die hauptsächliche IgA-Funktion in der Neutralisation von Krankheitserregern und Allergenen auf mukosalen Oberflächen besteht und daher eine Detektion SIT-induzierter, systemischer Veränderungen in der Peripherie nur bedingt möglich ist. Auch scheint die Differenzierung der IgA-Antikörper in die beiden Subklassen IgA1 und IgA2 eine erhebliche Rolle bei der Detektion SIT-induzierter Veränderungen zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass signifikante Unterschiede im Verlauf der Therapie nur innerhalb der allergenspezifischen IgA2-Subklasse nachzuweisen waren (Pilette et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit Veränderungen allergenspezifischer IgA2-Konzentrationen während der SIT stattgefunden haben, allerdings diese durch das vermehrte Vorkommen des IgA1-Subtyps im peripheren Blut (Verhältnis von 4:1) überlagert wurden (Janeway et al., 2002; S. 436).

5.1.3 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf T-Helfer-Zellen

Es wird angenommen, dass die Ausbildung IgE-vermittelter Allergien primär durch ein immunologisches Ungleichgewicht allergenspezifischer Th-Zellen mit Überwiegen einer Th2-medierten Immunantwort bedingt ist. Daher war die Detektion und Quantifizierung allergenspezifischer Th2- und Th1-Zellen bzw. deren assoziierter Zytokine im Verlauf der SIT von besonderem Interesse.

Auffallend bei der Frequenzanalyse IL-5-produzierender Th2-Zellen waren zunächst der substantielle Anstieg nach der Aufdosierungsphase sowie die signifikante Erhöhung während der ersten Pollenflugsaison nach Behandlungsbeginn. Der zu dieser frühen Phase der SIT auftretende, dominierende Phänotyp allergenspezifischer Th2-Zellen innerhalb der PBMC-Fraktion wurde auch von anderen Gruppen beobachtet. Dabei ist die schon zum Ende der Einleitungsphase ermittelte Erhöhung allergenspezifischer Th2-Zellen vermutlich auf die Dosissteigerung unter Therapie zurückzuführen (Benjaponpitak et al., 1999; Moverare et al., 1998). Die weitere Th2-Zellzunahme unter SIT beruht dagegen auf der zusätzlichen Allergenbelastung durch die saisonale Pollenexposition (Benson et al., 2000; Moverare et al., 1998). Dieser ebenfalls ausschließlich innerhalb der Pollenflugzeit in der Gruppe symptomatisch behandelter Birkenpollenallergiker beobachtete Anstieg allergenspezifischer Th2-Zellen zeigt, dass ein gewisser Grad an Allergenprästimulation nötig ist, um unverhältnismäßige Th2-Antworten im peripheren Blut von Allergikern *in vitro* detektieren zu können (Marshall et al., 1993; Van Overtvelt et al., 2008; Wosinska-Becler et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass sich die Anzahl Bet v 1-spezifischer T-

Zellen innerhalb saisonaler Allergenexposition von 10^{-6} auf 10^{-3} $CD4^{+}$ T-Zellen erhöhen kann (Van Overtvelt et al., 2008).

Interessanterweise konnten in den beiden nachfolgenden Pollenflugzeiten keine saisonalen Anstiege Bet v 1-spezifischer, IL-5-produzierender Zellen in den hyposensibilisierten Patienten beobachtet werden. Die Th2-Zellzahl blieb vielmehr über den weiteren Verlauf der SIT auf einem konstant verminderten Niveau. Im Rahmen der SIT zeigten andere Studien einhergehend mit der Reduktion klinischer Symptomatik sowohl keine Veränderungen in der IL-5-Produktion (Moverare et al., 2000; Till et al., 1997) als auch eine Abnahme der Th2-Zellen (Ebner et al., 1997; Gafvelin et al., 2005) sowie Th2-assoziiierter Zytokine (Jutel et al., 1995; Secrist et al., 1993). Die Diskrepanz zwischen den vorliegenden Daten und den Ergebnissen anderer Gruppen scheint im Aufbau der Studienprotokolle begründet, da einerseits Querschnittsanalysen mit longitudinalen Verläufen verglichen, andererseits für die Probenentnahme Zeitpunkte mit unterschiedlicher Allergenpräexposition (innerhalb bzw. außerhalb der Saison) gewählt wurden. In diesem Zusammenhang ist die Wahl geeigneter Beobachtungszeiträume bzw. eines engmaschigen Studiendesigns essentiell, um immunologische Modifikationen in der Peripherie auf zellulärer Ebene wie bspw. das in dieser Studie im späteren Therapieverlauf beschriebene SIT-induzierte Ausbleiben des Th2-Zellanstiegs während natürlicher Allergenexposition zu detektieren.

Auf Ebene der Th1-Zellen konnte eine gesteigerte Anzahl IFN γ -produzierender Zellen in dieser Arbeit zumindest tendenziell nach halbjähriger SIT bei hyposensibilisierten Birkenpollenallergikern sowie zum Zeitpunkt natürlicher Allergenexposition bei nicht-allergischen Probanden festgestellt werden. Bei unbehandelten RCA-Patienten wurden ähnlich den vorliegenden Ergebnissen konstante IFN γ -Level beschrieben (Benson et al., 2000), wobei auch erhöhte Th1-Antworten während der Pollenflugsaison detektiert werden konnten (Wang et al., 2009). *In vitro* Daten deuten prinzipiell darauf hin, dass hohe Allergenkonzentrationen, ähnlich der in der Erhaltungsphase der SIT applizierten Dosis, zu einer erhöhten Anzahl IFN $\gamma^{+}CD4^{+}$ T-Zellen führen. Unter SIT wurde dementsprechend eine abhängig von Allergendosis und Therapiedauer unterschiedlich stark ausgeprägte Zunahme der Produktion an IFN γ festgestellt (Akoum et al., 1996; Bellinghausen et al., 2003; Jutel et al., 1995; McHugh et al., 1995; Secrist et al., 1993). Damit einhergehend konnte zudem die Induktion einer T-Zellanergie sowie eine erhöhte Apoptose von IL-4 $^{+}$ T-Zellen festgestellt werden (Gardner et al., 2004). Möglicherweise ist diese direkt durch verstärkte Th1-Einflüsse auf molekularer Ebene bedingt, da die IFN γ -abhängige Induktion von Genen wie GZMB (Granzym B) zu einer vermehrten Apoptose von Th2-Zellen führen kann (Devadas et al., 2006). Zusätzlich übt IFN γ seine antagonistische Wirkung auf Th2-Zellen über eine Reihe weiterer Mechanismen aus. So inhibiert IFN γ einerseits die Th2-Zelldifferenzierung und -rekrutierung (Elser et al., 2002), die Th2-medierte Immunantwort durch die vermehrte Differenzierung naiver T-Zellen zu einem Th1-Phänotyp (Mullen et al., 2001; Snijders et al., 1998; Szabo et al., 2003) und in B-Zellen die IL-4-induzierte Expression des ϵ -Transkripts, wodurch eine IgE-Produktion verhindert wird (Venkataraman et al., 1999). Auf der anderen Seite fördert IFN γ die Suppression Th2-

assoziierter Zytokinausschüttung und die verminderte Rekrutierung von Effektorzellen zum Ort der Entzündungsreaktion (Teixeira et al., 2005).

Doch gibt es auch kontroverse Ergebnisse hinsichtlich einer bedeutsamen Rolle von IFN γ und Th1-Zellen bei der Immunmodulation durch die SIT. So fanden sich nach erfolgreicher Hyposensibilisierung in Patienten reduzierte allergenspezifische IFN γ -Antworten (O'Brien et al., 1997). Auch in dieser Arbeit konnten nach tendenziell erhöhten Th1-Zellfrequenzen zum Ende des ersten Behandlungsjahres keine Veränderungen in der Th1-Zellpopulation im weiteren Verlauf der SIT festgestellt werden. Gegen einen ausgeprägten Einfluss der Th1-Zellen spricht zudem, dass IFN γ die Produktion von IgG2-Antikörpern fördert, jedoch eine supprimierende Wirkung auf die IgG1-Synthese besitzt (Kawano et al., 1994), während in SIT-behandelten Patienten neben IgG4- hauptsächlich IgG1-Antikörper und nur in geringem Ausmaß Antikörper des IgG2-Isotyps detektiert werden konnten (Jutel et al., 2005; Mothes und Valenta, 2004; Niederberger et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Th1-assozierte Entzündungsreaktionen zu einer Verstärkung asthmatischer und allergischer Erkrankungen führen können (Hansen et al., 1999).

Als Folge der aufgeführten Beobachtungen einschließlich dem diskutierten Ungleichgewicht zwischen allergenspezifischen Th2- und Th1-Zellen als mögliche Ursache für das Auftreten allergischer Inhalationskrankheiten wird u.a. vermutet, dass eine erfolgreiche SIT einzig mit der Deviation allergenspezifischer T-Zellen vom Th2-Phänotyp mit Sekretion großer Mengen an IL-4 und IL-5 zu einer Th1-Zell-dominierten Immunantwort mit hoher IFN γ -Produktion einhergeht (Durham et al., 1991; Romagnani, 2006). In der vorliegenden Studie konnte tatsächlich eine signifikante Abnahme des allergenspezifischen Th2-/Th1-Quotienten nach einjähriger SIT detektiert werden, die den Wechsel einer initial vorherrschenden Th2-Immunantwort hin zu einem dominierenden Th1-Phänotyp andeutet. Weitere Studien zeigten nach Erreichen der Erhaltungsphase bzw. dem ersten Jahr unter SIT ähnliche Ergebnisse charakterisiert durch eine gesteigerte IFN γ - und reduzierte IL-4-Expression peripherer T-Zellen auf Zytokin- und mRNA-Ebene (Benjaponpitak et al., 1999; Bohle et al., 2007). Darüber hinaus wurde, wie in dieser Arbeit bestätigt, bei symptomatisch behandelten Birkenpollenallergikern innerhalb der Saison ein konträres Verhältnis allergenspezifischer Th2- zu Th1-Zellen aufgrund eines beachtlichen Th2-Zellanstiegs beobachtet (Gabrielsson et al., 1997; Imada et al., 1995; Wosinska-Becler et al., 2004). Diese Daten scheinen das Konzept der Th-Zell-Dichotomie mit antagonistischer Wirkung SIT-induzierter Th1-Zellen gegen pathogene, allergenspezifische Th2-Zellantworten zu unterstützen (Ebner et al., 1997; Secrist et al., 1993). Die im weiteren Verlauf der SIT erhobenen Daten führen jedoch zur Vermutung, dass die einfache Verlagerung einer Th2- zu einer Th1-Immunantwort auf T-Zellebene nicht ausschlaggebend für den klinischen Effekt der SIT ist. So konnte zwar im zweiten und dritten Jahr der SIT kein Anstieg allergenspezifischer Th2-Zellen mehr detektiert werden, allerdings kam es auch nicht zu einer kompensatorischen Zunahme von Th1-spezifischer Th1-Zellen. Es zeigten sich eher bei den hyposensibilisierten Patienten für beide Th-Zellsubpopulationen gleichermaßen verminderte Zellzahlen, welche vor allem bei den Th1-Zellen der Frequenz gesunder Probanden glichen.

Diese Beobachtungen sind mit einer SIT-vermittelten Anergieinduktion allergenspezifischer T-Zellen zu erklären (Schwartz, 2003). In Übereinstimmung hiermit zeigte sich unter SIT eine verminderte Reaktionsbereitschaft allergenspezifischer Th-Zellen nach Stimulation im Vergleich zu vor Therapiebeginn erhobenen Daten (Ebner et al., 1997; Pilette et al., 2007). Zudem fanden Mueller et al., dass durch Stimulation über den TCR bei Fehlen kostimulatorischer Signale T-Zellanergie induziert werden konnte (Mueller et al., 1990). Allergenspezifische Anergie ist prinzipiell reversibel, wie mittels exogener Zugabe von IL-2 und IL-15 nachgewiesen wurde (Akdis et al., 1996). Die Entstehung allergenspezifischer T-Zellanergie nach Applikation hoher Allergendosen wurde wiederholt als potentieller Wirkmechanismus der SIT diskutiert (Akdis et al., 1996; Baskar et al., 1997; Jutel et al., 1995; O'Brien et al., 1997; Till et al., 1997).

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Induktion von T-Zellapoptose. So könnte die repetitive allergenspezifische Stimulation von T-Zellen in kurzen Abständen während der SIT zur Expression der Apoptose-induzierenden Rezeptoren Fas und Fas-Ligand auf den T-Zellen mit nachfolgendem Zelltod geführt haben. Daher wäre auch eine von Bohle et al. diskutierte klonale Deletion allergenspezifischer Th-Zellen als potentielle Ursache für die beobachtete Reduktion der Zellfrequenzen nicht auszuschließen (Bohle et al., 2007). Allerdings konnte eine vorrangige Deletion allergenspezifischer Th2-Zellen (Gardner et al., 2004; Guerra et al., 2001) bzw. eine erhöhte Apoptoseanfälligkeit von Th1-Zellen (Janssen et al., 2000) anhand der parallelen Frequenzreduktion beider Th-Zellpopulationen unter SIT durch diese Studie nicht bestätigt werden. Schlussfolgernd legen diese Daten nahe, dass weitere Zellpopulationen an der Induktion von Toleranz in hyposensibilisierten Patienten beteiligt sind.

5.1.4 Einfluss der spezifischen Immuntherapie auf regulatorische T-Zellen

Wie im Kap. 1.7.2 erwähnt, können Treg-Zellen entweder im Thymus entstehen und in die peripheren lymphatischen Organe auswandern (Shevach et al., 2006) oder sich nach Antigenkontakt in der Peripherie entwickeln. Während thymusgenerierte Treg-Zellen durch die konstitutive Expression von Foxp3 (Foxp3⁺ nTreg-Zellen) charakterisiert sind (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003), werden die peripher induzierten Treg-Zellen in Foxp3⁺ und Foxp3⁻ iTreg-Zellen untergliedert (Curotto de Lafaille und Lafaille, 2009). Eine hypothetische Erklärung für die funktionelle Unterscheidung Foxp3⁺ Treg-Zellen besteht darin, dass Foxp3⁺ nTreg-Zellen ein TCR-Repertoire aufweisen, welches innerhalb des Thymus vorkommende Liganden erkennt. Foxp3⁺ iTreg-Zellen hingegen besitzen das gleiche TCR-Repertoire wie alle übrigen peripheren Foxp3⁻ T-Zellen, die eine Immunantwort gegen nicht im Thymus vorkommende Antigene hervorrufen. Es wird daher spekuliert, dass Foxp3⁺ iTreg-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Begrenzung immunologisch vermittelter Gewebeschädigungen nach chronischer Exposition gegenüber „nicht-selbst“-Antigenen, wie z.B. Umweltallergenen oder mikrobiellen Antigenen, einnehmen (Curotto de Lafaille et al., 2008).

5.1.4.1 Typ-1-regulatorische T-Zellen

Aufgrund der Beobachtung, dass IL-10 Anergie in CD4⁺ T-Zellen induziert (Akdis und Blaser, 1999; Akdis et al., 1998; Groux et al., 1996) sowie die Produktion allergieassoziiierter Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 unterdrückt (Pilette et al., 2007), nehmen IL-10⁺ Tr1-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Erforschung SIT-induzierter Toleranz ein (Larche, 2007; Möbs et al., 2008; Wu et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bet v 1-spezifischen Tr1-Zellen kein Foxp3 exprimieren. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass die supprimierende Aktivität der Tr1-Zellen auf eine Kontamination mit Foxp3⁺ nTreg-Zellen oder Foxp3⁺ iTreg-Zellen zurückging, die ähnliche regulatorische Funktionen besitzen (Vieira et al., 2004). Weiterhin können Tr1-Zellen, neben der hohen Expression an IL-10, vor allem funktionell von Foxp3⁺ Treg-Zellen durch die IL-10-vermittelte, kontaktunabhängige Inhibition des Teff-Zellwachstums in Kokultivierungsversuchen unterschieden werden (Bacchetta et al., 2002; Jonuleit et al., 2000; Satoguina et al., 2008; Wilczynski et al., 2008). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Tr1-Zellen in der vorliegenden Studie ihre supprimierende Aktivität auf Teff-Zellen über die Sekretion von IL-10 und nicht über kontaktabhängige Mechanismen ausübten, da in Kokultivierungsversuchen durch Zugabe von anti-IL-10-Antikörpern die Suppression der Teff-Zellproliferation vollständig aufgehoben wurde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine IL-10-abhängige Inhibition der Proliferation allergen- bzw. CD3/CD28-stimulierter T-Zellen festgestellt haben (Akdis et al., 2004; Bohle et al., 2007; Jutel et al., 2003; Satoguina et al., 2008; Yamanaka et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde von Akdis et al. beschrieben, dass die Induktion einer T-Zellanergie durch Blockade der CD28-Tyrosin-Phosphorylierung, dem initialen Schritt des kostimulatorischen CD28-Signalwegs, mittels IL-10 erreicht werden konnte (Akdis et al., 2000). Schließlich lagen die Tr1-Zellen selbst in einem Stadium der Anergie vor, da sie weder durch Bet v 1 noch durch anti-CD3 in Gegenwart von APC zur Proliferation angeregt werden konnten. Die im Verlauf der SIT detektierten IL-10-produzierenden Zellen entsprachen somit der Definition allergenspezifischer Tr1-Zellen (Bacchetta et al., 2002; Roncarolo et al., 2006).

Hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften wird diskutiert, ob die Suppression durch Tr1-Zellen in einer allergenspezifischen Weise stattfindet, d.h. ausschließlich Teff-Zellen mit gleicher Allergenspezifität durch Tr1-Zellen supprimiert werden können (Akdis et al., 2004). Unspezifische Suppressoraktivität von IL-10 wurde in Experimenten mit exogener Zugabe des supprimierenden Zytokins nachgewiesen (Jutel et al., 2003; Pilette et al., 2007). Zudem bestätigen Versuche, bei denen der Überstand von aktivierten Tr1-Zellklonen ausreichte, um das Wachstum proliferierender T-Zellkulturen zu inhibieren (Satoguina et al., 2008), dass eine Suppression des Teff-Zellwachstums durch das Zytokinmilieu und unspezifisch durch IL-10 vermittelt wird. *In vitro* Experimente deuteten ferner an, dass *in vivo* aktivierte, Bet v 1-spezifische Tr1-Zellen in der Lage sind, die Proliferation von Teff-Zellen anderer Spezifität zu inhibieren (Bohle et al., 2007). Der von Akdis et al. beobachtete Effekt einer allergenspezifischen Suppression scheint daher lediglich auf limitierten Tr1-Zellzahlen begründet zu sein, die einen Schwellenwert für die unspezifische Suppression noch nicht überschritten haben (Akdis et al., 2004). Es wird deshalb spekuliert, ob abhängig von der

Frequenz der erste Kontakt zwischen APC und T-Zelle entscheidend für die Generierung einer spezifischen induzierenden oder supprimierenden Immunantwort ist (Akdis et al., 2004; Meiler et al., 2008b), da IL-10 bekanntlich die antigenpräsentierende Kapazität von DZ und Monozyten/Makrophagen durch das Herunterregulieren der HLA-DR-Expression, kostimulatorischer Moleküle sowie verschiedener Zytokine beeinflusst (Moore et al., 2001). Findet folglich der erste Kontakt zwischen APC und Tr1-Zelle statt, wäre eine durch IL-10 vermittelte Verminderung der antigenpräsentierenden Kapazität vorstellbar.

Im Verlauf der SIT wurde bereits nach drei Monaten ein Anstieg allergenspezifischer Tr1-Zellfrequenzen in den behandelten Patienten festgestellt. Die Frequenz Bet v 1-reaktiver Tr1-Zellen erreichte ihr Maximum nach einem halben Jahr während der Birkenpollensaison und war auch nach zwölfmonatiger Therapie im Vergleich zu den Werten vor Behandlungsbeginn weiterhin signifikant erhöht. Der frühe Anstieg allergenspezifischer Tr1-Zellen in der Aufdosierungsphase wurde auch durch andere Gruppen beschrieben (Akdis et al., 1998; Bohle et al., 2007; Pilette et al., 2007), doch sind Daten über die Persistenz dieser Zellpopulation im Verlauf der SIT widersprüchlich. Bohle et al. konnten eine erhöhte Anzahl IL-10-sezernierender CD3⁺ T-Zellen in Birkenpollenallergikern lediglich während der Aufdosierungsphase, aber nicht mehr nach einjähriger SIT feststellen (Bohle et al., 2007). Dagegen wurde der vorliegenden Studie entsprechend nach einjähriger Therapie in SIT-behandelten Patienten eine vermehrte IL-10-Produktion beschrieben, die als Zeichen einer anhaltenden Erhöhung an Tr1-Zellen gedeutet wurde (Pilette et al., 2007). Diese Unterschiede könnten möglicherweise auf die verschiedenen Applikationsformen der SIT (sublingual bzw. subkutan) zurückzuführen sein.

Darüber hinaus stellt sich bei dem unter SIT beobachteten Tr1-Zellanstieg die Frage, ob dieser als ein Resultat klonaler Expansion existierender allergenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen anzusehen ist bzw. ob eine *de novo* Generierung von Tr1-Zellen aus dem Pool naiver T-Zellen stattgefunden hat. Für letztere Annahme spricht die Tatsache, dass sich *in vitro* aus naiven CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von IL-10 Tr1-Zellen differenzieren können (Bacchetta et al., 2002). Im Gegensatz dazu haben Untersuchungen peripherer T-Zellantworten in nicht-allergischen Bienenzüchtern gezeigt, dass allergenspezifische IFN γ -, IL-4- und IL-10-sezernierende T-Zellen aus klonalen T-Zellpopulationen bestehen (Meiler et al., 2008b). Nach vermehrter Allergenexposition konnte dabei eine Zunahme der klonalen Expansion von T-Zellen innerhalb der IL-10-produzierenden Population festgestellt werden, während im gleichen Zeitraum die klonale Expansion innerhalb der IFN γ -sezernierenden T-Zellen abnahm oder vollständig verloren ging. Ein mittels Analyse von TCR *rearrangements* vor Beginn der Bienensaison detektierter Klon verschwand in der Population IFN γ -sezernierender T-Zellen und erschien nach starker Allergenbelastung (multiple Bienenstiche) in der IL-10-produzierenden T-Zellpopulation (Meiler et al., 2008b). Diese Daten legen nahe, dass die kontinuierliche Allergenexposition eine *in vivo* Expansion von IL-10-produzierenden, allergenspezifischen T-Zellen auf Kosten von IFN γ - (Th1-) oder IL-4-produzierenden (Th2-) Zellen induziert und würden damit auf eine hohe Plastizität allergenspezifischer T-Zellen hinweisen. Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der SIT vorliegen, wodurch das im Verlauf der Therapie gegenüber den Ausgangswerten konstant reduzierte Th2/Tr1-Zellverhältnis zu erklären wäre. Mit der

Applikation höherer Allergendosen zum Beginn der Erhaltungsphase der SIT, entsprechend dem hochdosierten Apitoxin nach mehrfachen Bienenstichen, konnte in dieser Studie die Induktion der Tr1-Zellen detektiert werden. Es kann jedoch hierbei nicht geklärt werden, ob es sich um einen *in vivo* Wechsel zu oder eine Neugenerierung von Tr1-Zellen handelte. Allerdings sprechen die gleichzeitige Zunahme der allergenspezifischer Th2- und Tr1-Zellen innerhalb der ersten Birkenpollensaison sowie die konstant niedrigen Frequenzen aller T-Zellpopulationen im weiteren Behandlungsverlauf eher gegen diese Hypothese.

Interessanterweise zeigte sich bei den Tr1-Zellen trotz signifikanter Erhöhung im ersten Jahr der SIT gegenüber den Werten zu Therapiebeginn bereits nach zwölf Monaten eine abnehmende Zellzahl. In den folgenden Jahren konnten zudem analog den Th-Zellen keine deutlichen Frequenzerhöhungen im peripheren Blut mehr detektiert werden. Die Anzahl allergenspezifischer Tr1-Zellen entsprach ab diesem Zeitpunkt dem Niveau gesunder Probanden. Dementsprechend wiesen Birkenpollenallergiker nach 18-monatiger SIT keine Unterschiede in der IL-10-Produktion im Vergleich zu gesunden Probanden auf (Moverare et al., 2000). Andererseits wurden nach zweijähriger SIT innerhalb der Pollensaison lokale Anstiege CD3⁺IL-10⁺ Zellen in der nasalen Mukosa hyposensibilisierter Pollenallergiker detektiert (Pilette et al., 2007). Es ist jedoch möglich, dass lediglich eine saisonale Rekrutierung Tr1-ähnlicher Zellpopulationen aus der Peripherie zum Effektororgan, wie bei CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen diskutiert, stattgefunden hat (Anderson et al., 2009). Dennoch erscheint die SIT-vermittelte Reduktion des Th2/Tr1-Quotienten ein wesentlicher Faktor bei der initialen Induktion von Allergentoleranz zu sein. Die transiente Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen könnte in den peripheren Th-Zellen eine IL-10-vermittelte Anergie induzieren (Akdis und Blaser, 1999; Akdis et al., 1998; Groux et al., 1996), somit der zu Therapiebeginn noch Th2-dominierten, inflammatorischen Immunantwort entgegensteuern und auf diese Weise zur Verbesserung der klinischen Beschwerden beitragen. Neben einer IL-10-induzierten Th-Zellanergie wäre in diesem Zusammenhang auch die Möglichkeit einer direkten Hemmung allergenspezifischer Effektorzellen (bspw. Mastzellen) zu nennen (Royer et al., 2001). Zudem lässt sich darüber spekulieren, ob der Verlust einer allergenspezifischen Th2-Antwort in den nachfolgenden Birkenpollenflugzeiten letztendlich keine Gegenregulation durch aktive Suppression mittels Tr1-Zellen erforderte, so dass andauernde Tr1-Zellzunahmen ausblieben.

Abgesehen von IL-10 werden weitere Faktoren bei der Suppression von Teff-Zellantworten durch Tr1-Zellen diskutiert. In einigen Experimenten wurde zusätzlich zur gesteigerten IL-10-Sekretion eine erhöhte TGF- β -Produktion durch Tr1-Zellen nachgewiesen, so dass die supprimierenden Effekte von Tr1-Zellen beiden Zytokinen gemeinsam zugesprochen wurden (Roncarolo et al., 2006). Es ist bekannt, dass TGF- β einen wesentlichen Faktor sowohl für die Suppression mukosaler, allergenspezifischer T-Zellaktivierung (Akdis et al., 2004) als auch bei der Induktion der IgA-Sekretion in B-Zellen darstellt (Cazac und Roes, 2000; Letterio und Roberts, 1998; Schmidt-Weber und Blaser, 2004). Des Weiteren induziert TGF- β die Expression von Foxp3 (Fantini et al., 2004; Marie et al., 2005; Mothes et al., 2003) und die Expansion von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen (Bez et al., 2004; Huber und Schramm, 2006; Szabo et al., 2003). TGF- β ist zudem in der Lage, die Th1- bzw. Th2-assoziierten Transkriptionsfaktoren

T-bet und GATA-3 zu inhibieren (Gorelik et al., 2002; Gorelik et al., 2000; Heath et al., 2000). Bei der Suppression von Teff-Zellantworten scheint IL-10 jedoch eine übergeordnete Rolle zu spielen, da wie in der vorliegenden Studie gezeigt, die supprimierende Kapazität der Tr1-Zellen vollständig durch die Neutralisation von IL-10 aufgehoben werden konnte. Zusätzlich lässt die in den behandelten Patienten ausbleibende Induktion allergenspezifischer IgA-Antikörper auf eine möglicherweise untergeordnete Rolle von TGF- β bei der Tr1-vermittelten Toleranzinduktion schließen.

5.1.4.2 Typ-1-regulatorische T-Zellen und die „gesunde“ Immunantwort

Wie beschrieben, besitzen Tr1-Zellen das Potential, die Entwicklung allergischer Th2-Antworten zu verhindern, indem sie die Proliferation und Zytokinproduktion von Teff-Zellen inhibieren. Es stellt sich daher die Frage, ob die Induktion von Tr1-Zellen eine Rolle bei der Immunantwort gesunder Individuen gegenüber unbedenklichen Umweltallergenen spielt (Akdis, 2006b; Akdis et al., 2004; Jutel et al., 2003). Das Vorherrschen allergenspezifischer Tr1-Zellen, besonders im Verhältnis zu allergieassoziierten Th2-Zellen, wird während natürlicher Allergenexposition bei Nicht-Allergikern als ein möglicher protektiver Mechanismus angesehen. Doch gibt es in gesunden Individuen eine weite Spannbreite spezifischer Reaktionen gegenüber Allergenen, die von nicht-detektierbaren Immunantworten bis hin zur Beteiligung aktiver, peripherer Toleranzmechanismen reichen (Akdis, 2006b). In dieser Arbeit konnten, analog zu anderen Studien allergenspezifische, IL-10-produzierende Tr1-Zellen nicht als die dominierende Population in gesunden Kontrollprobanden unter natürlicher Allergenexposition identifiziert werden (Bullens et al., 2005; Van Overtvelt et al., 2008). Die in einer großen Anzahl nicht-allergischer Individuen ausbleibende T-Zellantwort gegenüber Allergenen ist anscheinend in den, aufgrund fehlender Exposition bzw. Exposition unterhalb eines zur Sensibilisierung führenden Schwellenwertes, sehr geringen Frequenzen allergenspezifischer T-Zellen begründet. Eine aktive Suppression allergenspezifischer Teff-Zellen durch Tr1-Zellen ist daher nur in sensibilisierten, aber (klinisch) gesunden Individuen erforderlich (Akdis et al., 2004; Ling et al., 2004; Meiler et al., 2008b). In diesem Zusammenhang wurde von Platts-Mills et al. der Begriff der „modifizierten Th2-Antwort“ eingeführt, der das Vorkommen eines allergenspezifischen Antikörperprofils mit hohen IgG- und geringen IgE-Serumkonzentrationen sowie erhöhter IL-10-Produktion nach spezifischer Stimulation ohne Vorliegen allergischer Symptome umfasst (Platts-Mills et al., 2001; Woodfolk, 2007). Somit lässt sich die Vermutung anstellen, dass erst nach repetitiver, sensibilisierender Allergenexposition, wie bspw. bei Bienenzüchtern oder Tierhaltern, eine protektive Immunantwort mit erhöhten IgG-Antikörperkonzentrationen und vermehrten Tr1-Zellen gegenüber dem entsprechenden Allergen entstehen kann.

5.1.4.3 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

Im Gegensatz zur IL-10-vermittelten Suppression durch Tr1-Zellen inhibieren Foxp3⁺ Treg-Zellen Teff-Zellen zellkontaktabhängig (Ko et al., 2005). Diese Treg-Population ist zudem durch kein definiertes Zytokinmuster, sondern durch die Expression von membrangebundenem CD25

und intrazellulärem Foxp3 charakterisiert (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). In dieser Studie wurde die Anzahl Foxp3⁺ Treg-Zellen anhand der Expression des Markerprofils CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ermittelt. Die Frequenzbestimmung basiert dabei auf der Erkenntnis, dass der intrazelluläre Marker Foxp3 invers mit dem Oberflächenmolekül CD127 korreliert (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Letzteres ist Bestandteil des heterodimeren IL-7-Rezeptors (Hofmeister et al., 1999), und neuere Daten legen nahe, dass die direkte Interaktion zwischen Foxp3 und dem CD127-Promotor zu einer reduzierten Expression von CD127 in Treg-Zellen beiträgt (Liu et al., 2006). Die CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Population umfasst daher sowohl die peripher induzierten Foxp3⁺ iTreg-Zellen als auch die im Thymus generierten und anschließend in die Peripherie ausgewanderten Foxp3⁺ nTreg.

Die Frequenzanalyse der CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Zellen ergab aufgrund der geringen Fallzahl keine signifikanten Unterschiede im Behandlungsverlauf. Allerdings kann über einen SIT-induzierten Effekt spekuliert werden, da der Prozentsatz an Treg-Zellen in den hyposensibilisierten Patienten nach 30-monatiger SIT tendenziell zuzunehmen schien. In Bezug auf therapievermittelte Modifikationen wurde ein Anstieg peripherer Foxp3⁺ Treg-Zellen bei Insektengiftallergikern im ersten Jahr unter SIT detektiert (Pereira-Santos et al., 2008). Zudem berichteten Radulovic et al. von einem signifikanten Anstieg CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen in der nasalen Mukosa von Graspollenallergikern nach zweijähriger SIT während natürlicher Allergenexposition innerhalb der Gräserpollensaison (Radulovic et al., 2008). Für einen quantitativen Einfluss sprechen auch Beobachtungen bei Nahrungsmittelallergikern, da spontane Remissionen mit erhöhten Frequenzen peripherer CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen einhergingen (Karlsson et al., 2004; Shreffler et al., 2009). Im Gegensatz dazu sind weder in Birkenpollenallergikern nach sechs Monaten Therapie (Grindebacke et al., 2009) noch in Hausstauballergikern nach einjähriger SIT (Ajduk et al., 2008) Veränderungen in der Frequenz CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen festgestellt worden. Weiterhin konnten keine quantitativen Unterschiede an CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen zwischen Birkenpollenallergikern und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Bellinghausen et al., 2003; Grindebacke et al., 2009; Yamanaka et al., 2009). Es ist daher zu diskutieren, ob die konträren Ergebnisse auf der Untersuchung unterschiedlicher Kompartimente (peripheres Blut bzw. Effektororgan), auf dem auslösenden Allergen oder auf der Charakterisierung verschiedener Phänotypen (z.B. CD4⁺CD25⁺, CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Zellen) beruhen.

In diesem Zusammenhang werden quantitative Aspekte als eine Möglichkeit für die *in vitro* detektierte Reduktion der Suppressoraktivität CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen diskutiert. Aufgrund experimenteller Limitationen ist es wahrscheinlich, dass Treg-Populationen nach der Isolierung über die beiden Oberflächenmarker CD4 und CD25 einen gewissen Anteil an CD4⁺CD25⁺ Teff-Zellen beinhalten. So kann eine durch die erhöhte Anzahl aktivierter allergenspezifischer CD4⁺CD25⁺ Teff-Zellen hervorgerufene „Ausdünnung“ der Treg-Zellpopulation als potentielle Ursache genannt werden. Die gleichzeitig erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern wie CD69 oder HLA-DR während der Pollensaison sowie die wesentliche Zunahme in der Anzahl IL-5-sezierender CD4⁺CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺CD25⁺ Treg-Population sprechen für diese Hypothese (Anderson et al., 2009). Weiterhin wäre die Rekrutierung

allergenspezifischer Treg-Zellen zu den Effektororganen allergischer Erkrankung mit der Folge einer Reduktion der Anzahl suppressorischer Foxp3^+ Treg-Zellen im peripheren Blut als Grund für eine verminderte Suppressoraktivität $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen anzusehen (Anderson et al., 2009). In diesem Zusammenhang wurde unlängst nachgewiesen, dass die Anzahl Foxp3^+ T-Zellen in der nasalen Mukosa von Patienten mit allergischer Rhinitis innerhalb der Pollenflugsaison anstieg (Radulovic et al., 2008). Diese Beobachtungen wären somit auch ein Erklärungsansatz für die Abnahme $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ Treg-Zellen in der Gruppe symptomatisch behandelter Allergiker während der Birkenpollensaison.

Des Weiteren könnte die SIT eher zu qualitativen als quantitativen Veränderungen von Foxp3^+ Treg-Zellen führen. Studien mit Fokus auf qualitative Unterschiede haben ergeben, dass aus dem peripheren Blut von Allergikern gewonnene $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen zwar prinzipiell in der Lage waren, allergenstimulierte T-eff-Zellkulturen zu supprimieren (Bellinghausen et al., 2003; Bohle et al., 2007; Tiemessen et al., 2002), allerdings zeigte sich, dass $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen von Pollenallergikern im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine verminderte Kapazität besaßen, die Proliferation sowie die Zytokinproduktion von Th2-Zellen zu inhibieren (Grindebacke et al., 2009; Ling et al., 2004; Thunberg et al., 2007). Dieser Effekt war zudem verstärkt zu beobachten, wenn die $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen innerhalb der Pollenflugsaison isoliert wurden (Anderson et al., 2009; Grindebacke et al., 2009; Ling et al., 2004). Dagegen fand sich im peripheren Blut gesunder Individuen nach Depletion $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen eine ähnliche Th2-Zellproliferation und Zytokinproduktion nach Allergenstimulation wie in allergischen Patienten. Somit könnte dem Anstieg allergenspezifischer T-Zellfrequenzen bei Allergikern während der Pollenflugzeit eine verminderte suppressorische Kapazität $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ Treg-Zellen zugrunde liegen (Anderson et al., 2009). Bemerkenswerterweise konnte dieser qualitative Unterschied jedoch nicht durch eine SIT aufgehoben werden (Grindebacke et al., 2009). Infolgedessen bleibt die Rolle Foxp3^+ Treg-Zellen bei der Entwicklung von Allergintoleranz durch die SIT letztendlich noch im Unklaren.

5.1.5 Weitere immunmodulatorische Effekte der spezifischen Immuntherapie

Neben den in dieser Studie beschriebenen zellulären und humoralen Veränderungen vermittelt die SIT darüber hinaus eine Reihe weiterer immunmodulatorischer Effekte. So ist im Rahmen einer Hyposensibilisierung neben der Unterdrückung der Spätphasenreaktion der Typ-I-Reaktion (Durham und Till, 1998) eine reduzierte Reaktivität von Basophilen gegenüber Allergenen (Kimura et al., 1985), einhergehend mit der Inhibition der Histamin- und Leukotrienfreisetzung nach Allergenstimulation (Pierkes et al., 1999), zu beobachten. Des Weiteren reduziert die SIT in der Mukosa den saisonalen Anstieg von eosinophilen und basophilen Granulozyten (Rak et al., 2001; Wilson et al., 2001) sowie in der Haut die Anzahl an Mastzellen (Durham et al., 1999a).

5.2 Immunregulatorische Interaktionen im Kontext der spezifischen Immuntherapie

Wie in dieser Arbeit dargestellt, sind diverse immunregulatorische Faktoren an einer allergenspezifischen Toleranzinduktion beteiligt. So führt die SIT auf humoraler Ebene zur vermehrten Synthese allergenspezifischer IgG4-Antikörper. Die zelluläre Immunantwort ist dagegen u.a. durch die transiente Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen sowie im späteren Behandlungsverlauf durch den von einigen Autoren beschriebenen Anstieg CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen gekennzeichnet (Pereira-Santos et al., 2008; Radulovic et al., 2008). In diesem Zusammenhang stellt sich die interessante Frage, ob bzw. in welcher Weise die SIT-modifizierte T-Zellantwort Einfluss auf die humorale Immunantwort nehmen könnte. Da die Produktion von IgE- und IgG4-Antikörpern durch die Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 induziert wird (Lundgren et al., 1989; Punnonen et al., 1993), wäre aufgrund der Abnahme allergenspezifischer Th2-Zellen nach 18-monatiger SIT unter das Ausgangsniveau zumindest eine Reduktion der IgE-Antikörperproduktion zu vermuten. Allerdings führt die SIT neben der Induktion allergenspezifischer IgG4-Antikörper nur zu marginal veränderten IgE-Konzentrationen (Dolz et al., 1996; Moller et al., 1987; Moverare et al., 2000; Rossi et al., 2007). Signifikant verringerte Serumkonzentrationen allergenspezifischer IgE-Antikörpern sind oft erst nach mehreren Jahren zu detektieren (Bahceciler et al., 2005). Der beachtliche zeitliche Unterschied zwischen den allergenspezifischen Veränderungen auf T-Zellebene und den IgE-Antikörperkonzentrationen kann jedoch nicht durch die Halbwertszeit dieser Antikörperklasse (~2,5 Tage) erklärt werden (Akdis, 2009; Meiler et al., 2008a). Stattdessen könnte die Aufrechterhaltung der allergenspezifischen IgE-Serumkonzentrationen über den gesamten Beobachtungszeitraum der SIT vielmehr auf der Existenz langlebiger IgE-produzierender Plasmazellen im Knochenmark beruhen (Radbruch et al., 2006).

Für die bereits frühzeitige und über den Therapieverlauf anhaltende Zunahme allergenspezifischer IgG4-Antikörper bieten spezifische Wechselbeziehungen zwischen Treg- und B-Zellen einen möglichen Erklärungsansatz. Wie beschrieben, wird sowohl die Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen (Bellinghausen et al., 1997; Bohle et al., 2007; Pilette et al., 2007) als auch CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen (Pereira-Santos et al., 2008; Radulovic et al., 2008) im Rahmen einer SIT als wichtiger Faktor bei der erfolgreichen Behandlung von Allergien angesehen. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich für beide Treg-Populationen ein direkter Einfluss auf die Modulation der Antikörperproduktion durch B-Zellen nachgewiesen werden (Meiler et al., 2008a; Satoguina et al., 2008; Satoguina et al., 2005). Auf mRNA- und Proteinebene sowie anhand von Plasmazellfrequenzen konnte gezeigt werden, dass Tr1-Zellen in der Lage waren, über die Sekretion von IL-10 die Produktion von IgE-Antikörpern zu vermindern und einen Anstieg der IgG4-Sekretion zu induzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden für CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen ermittelt, wobei die Induktion der IgG4-Produktion im Gegensatz zu Tr1-Zellen, vermutlich aufgrund der geringeren IL-10-Sekretion, vermindert ausfiel. Eine Erhöhung der IgE- und IgG4-Produktion fand sich auch nach Kokultivierung mit IL-4-produzierenden T-Zellen, während weder IFN γ -sezernierende T-Zellen noch CD4⁺CD25⁻ Teff-Zellpopulationen eine Auswirkung auf die Antikörperproduktion durch B-Zellen aufwiesen. Die

beobachtete Regulation scheint auf IL-10-vermittelten Mechanismen zu basieren, da einerseits nach exogener IL-10-Gabe ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Induktion der IgG4- bzw. Reduktion der IgE-Antikörperproduktion nachgewiesen, andererseits durch neutralisierende Antikörper die IL-10-induzierten Effekte aufgehoben werden konnten (Meiler et al., 2008a; Satoguina et al., 2008). Es zeigte sich zudem, dass neben IL-10 auch Interaktionen zwischen GITR und GITRL sowie TGF- β die Sekretion von IgG4-Antikörpern durch B-Zellen beeinflussten, da anhand deren selektiver Blockade die Tr1-Zell- bzw. CD4⁺CD25⁺ Treg-Zell-induzierte Antikörperproduktion verringert wurde (Satoguina et al., 2008). Diese Ergebnisse deuten an, dass Wechselbeziehungen zwischen GITR und GITRL die Induktion von IgG4-Antikörpern über einen IL-10-abhängigen Weg modulieren können, wobei ein direkter Zellkontakt zwischen Treg- und B-Zellen notwendig zu sein scheint. Interessanterweise korrelierte zudem der Anstieg der Foxp3-Expression in Treg-Zelllinien mit dem Vermögen, die IgG4-Produktion in B-Zellen zu induzieren (Satoguina et al., 2008). Ein Einfluss von Tr1-Zellen sowie CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen auf die Produktion von IgA-Antikörpern wurde dagegen nicht nachgewiesen (Meiler et al., 2008a).

Die in dieser Arbeit im ersten Jahr der Therapie beobachtete, nahezu parallel verlaufende Zunahme SIT-induzierter Tr1-Zellen und IgG4-Antikörper kann als indirekter Nachweis für den beschriebenen modulierenden Einfluss allergenspezifischer Tr1-Zellen auf die Antikörperproduktion angesehen werden. Aufgrund der transienten Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen und einer IgG4-Halbwertszeit von 23 Tagen (Akdis, 2009) müssen jedoch zusätzliche Faktoren zum kontinuierlichen Anstieg der IgG4-Antikörperkonzentrationen im weiteren Verlauf der SIT beitragen. Neben der Annahme, dass wie zuvor langlebige Plasmazellen an der Aufrechterhaltung der Sekretion spezifischer IgG4-Antikörper beteiligt sein könnten (Hiepe und Dorner, 2005; Radbruch et al., 2006), wäre auch ein Vorkommen weiterer IL-10-Ressourcen als potentielle Ursache für die sukzessiv erhöhten IgG4-Antikörperkonzentrationen in Erwägung zu ziehen. So kann die direkte bzw. durch „*bystander suppression*“ vermittelte IL-10-Sekretion von CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen als eine mögliche neue IL-10-Quelle angeführt werden (Asseman et al., 1999; Fontenot et al., 2003; Wilczynski et al., 2008), da im Verlauf der SIT signifikante Anstiege CD4⁺CD25⁺ Treg-Zellen detektiert werden konnten (Pereira-Santos et al., 2008; Radulovic et al., 2008). Weiterhin wurde eine gesteigerte Produktion von IL-10 durch B-Zellen, Monozyten und Makrophagen unter SIT beschrieben (Akdis et al., 1998; Francis et al., 2003; Nouri-Aria et al., 2004). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass durch IgG-Antikörper aktivierte Monozyten IL-10 sezernieren (Pilette et al., 2007). Die anfängliche IL-10-Produktion durch Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen könnte somit im späteren Verlauf der SIT von IgG-aktivierten Monozyten übernommen und dadurch die IL-10-vermittelte, SIT-induzierte Anergie in den allergenspezifischen T-Zellpopulationen trotz erniedrigter Tr1-Zellfrequenzen aufrechterhalten werden.

Darüber hinaus stützen die hier vorgestellten Daten eine kürzlich von Blaser aufgestellte Hypothese zur SIT-induzierten Immuntoleranz in peripheren T-Zellen (Blaser, 2008). Es ist bekannt, dass sowohl GATA-3 als auch IL-4 direkt die Expression des Transkriptionsfaktors

Foxp3 inhibieren (Mantel et al., 2007). Neben der Annahme, dass die SIT-vermittelte Induktion allergenspezifischer Tr1-Zellen im Verlauf der Therapie zu einer Inhibition Th2-abhängiger Zellproliferation und Zytokinproduktion führt, wurde zudem nachgewiesen, dass IL-10 *in vitro* die Expression von Foxp3 unter IL-4/IL-12-neutralisierenden Bedingungen fördert (Karagiannidis et al., 2004). Der Erfolg einer SIT auf zellulärer Ebene könnte folglich darin bestehen, dass der bei bestehender Allergie unterdrückende Effekt unverhältnismäßiger Th2-Antworten auf die Formation Foxp3⁺ Treg-Zellen durch die IL-10-Sekretion der Tr1-Zellen unterbunden werden könnte. Zusätzlich würde durch die Generierung ausreichender Foxp3⁺ Treg-Frequenzen eine periphere T-Zelltoleranz gegenüber harmlosen Umweltallergenen wieder hergestellt sowie auf humoraler Ebene eine potentielle IL-10-Quelle zur Aufrechterhaltung allergenspezifischer IgG4-Antikörperkonzentrationen bereitgestellt werden. Gegen diese Hypothese könnte allerdings die geringe Frequenz allergenspezifischer CD4⁺ Tr1-Zellen sprechen, die innerhalb der gesamten CD4⁺CD25⁺ Treg-Population lediglich zwischen 1:10³ und 0,5:10⁴ variiert (Meiler et al., 2008b).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die aufgeführten Beispiele aus der Literatur, dass die SIT-vermittelte Toleranzinduktion bei Typ-I-Allergien auf multifaktoriellen, sich potentiell gegenseitig beeinflussenden Mechanismen beruht. Anhand des engmaschigen Studiendesigns über einen Verlauf von drei Jahren konnte in diesem Zusammenhang nachgewiesen werden, dass die bei einer SIT gegen Birkenpollenallergene induzierten immunregulatorischen Vorgänge einer zeitlichen Dynamik unterliegen, bei der zelluläre sowie humorale Faktoren phasenabhängig im unterschiedlichen Ausmaß an der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung allergenspezifischer Toleranz beteiligt sind.

6 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., and Schuurman, J. (2002). IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105, 9-19.
- Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., and Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39, 469-477.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- Ajduk, J., Marinic, I., Aberle, N., Rabatic, S., and Gagro, A. (2008). Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 100, 314-322.
- Akdis, C. A. (2006a). Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. *Curr Opin Immunol* 18, 718-726.
- Akdis, C. A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S. S., Muller, U., and Blaser, K. (1996). Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* 98, 1676-1683.
- Akdis, C. A., and Blaser, K. (1999). IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *Faseb J* 13, 603-609.
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 102, 98-106.
- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. (2001). Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 180-182.
- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A., and Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *Faseb J* 14, 1666-1668.
- Akdis, M. (2006b). Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 18, 738-744.
- Akdis, M. (2009). Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol* 21, 700-707.
- Akdis, M., Blaser, K., and Akdis, C. A. (2005). T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116, 961-968; quiz 969.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., et al. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 199, 1567-1575.
- Akoum, H., Tsicopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B., Dessaint, J. P., Joseph, M., Hamid, Q., and Tonnel, A. B. (1996). Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 87, 593-598.

- Alton, E. W., and Norris, A. A. (1996). Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 98, S102-105; discussion S105-106.
- Anderson, A. E., Mackerness, K. J., Aizen, M., Carr, V. A., Nguyen, D., Du Pre, F., Durham, S. R., and Robinson, D. S. (2009). Seasonal changes in suppressive capacity of CD4+ CD25+ T cells from patients with hayfever are allergen-specific and may result in part from expansion of effector T cells among the CD25+ population. *Clin Exp Allergy* 39, 1693-1699.
- Anhoj, C., Backer, V., and Nolte, H. (2001). Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *Allergy* 56, 548-552.
- Antunez, C., Mayorga, C., Corzo, J. L., Jurado, A., and Torres, M. J. (2008). Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol* 19, 210-218.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199, 1401-1408.
- Asai, K., Kitaura, J., Kawakami, Y., Yamagata, N., Tsai, M., Carbone, D. P., Liu, F. T., Galli, S. J., and Kawakami, T. (2001). Regulation of mast cell survival by IgE. *Immunity* 14, 791-800.
- Asher, M. I., Montefort, S., Bjorksten, B., Lai, C. K., Strachan, D. P., Weiland, S. K., and Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368, 733-743.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004.
- Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M. G. (2002). Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 32, 2237-2245.
- Bahceciler, N. N., Arikan, C., Taylor, A., Akdis, M., Blaser, K., Barlan, I. B., and Akdis, C. A. (2005). Impact of sublingual immunotherapy on specific antibody levels in asthmatic children allergic to house dust mites. *Int Arch Allergy Immunol* 136, 287-294.
- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., and Wright, A. L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 343, 538-543.
- Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med* 139, 359-370.
- Barnes, P. J., Chung, K. F., and Page, C. P. (1998). Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50, 515-596.

- Baskar, S., Hamilton, R. G., Norman, P. S., and Ansari, A. A. (1997). Grass immunotherapy induces inhibition of allergen-specific human peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Int Arch Allergy Immunol* 112, 184-190.
- Bellinghausen, I., Klostermann, B., Knop, J., and Saloga, J. (2003). Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 111, 862-868.
- Bellinghausen, I., Knop, J., and Saloga, J. (2006). [Mechanisms of specific immunotherapy]. *Hautarzt* 57, 855-859.
- Bellinghausen, I., König, B., Bottcher, I., Knop, J., and Saloga, J. (2005). Regulatory activity of human CD4 CD25 T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology* 116, 103-111.
- Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A. H., Christmann, S., Knop, J., and Saloga, J. (1997). Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol* 27, 1131-1139.
- Benjaponpitak, S., Oro, A., Maguire, P., Marinkovich, V., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (1999). The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 103, 468-475.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.
- Benson, M., Strannegard, I. L., Strannegard, O., and Wennergren, G. (2000). Topical steroid treatment of allergic rhinitis decreases nasal fluid TH2 cytokines, eosinophils, eosinophil cationic protein, and IgE but has no significant effect on IFN-gamma, IL-1beta, TNF-alpha, or neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* 106, 307-312.
- Bez, C., Schubert, R., Kopp, M., Ersfeld, Y., Rosewich, M., Kuehr, J., Kamin, W., Berg, A. V., Wahu, U., and Zielen, S. (2004). Effect of anti-immunoglobulin E on nasal inflammation in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 34, 1079-1085.
- Birkner, T., Rumpold, H., Jarolim, E., Ebner, H., Breitenbach, M., Skvaril, F., Scheiner, O., and Kraft, D. (1990). Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy* 45, 418-426.
- Bisgaard, H., Hermansen, M. N., Loland, L., Halkjaer, L. B., and Buchvald, F. (2006). Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. *N Engl J Med* 354, 1998-2005.
- Blaser, K. (1996). Allergen dose dependent cytokine production regulates specific IgE and IgG antibody production. *Adv Exp Med Biol* 409, 295-303.
- Blaser, K. (2008). [Immunological principles of allergen-specific immune therapy]. *Hno* 56, 759-763.

- Bodtger, U., Ejrnaes, A. M., Hummelshoj, L., Jacobi, H. H., Poulsen, L. K., and Svenson, M. (2005). Is immunotherapy-induced birch-pollen-specific IgG4 a marker for decreased allergen-specific sensitivity? *Int Arch Allergy Immunol* 136, 340-346.
- Bodtger, U., Poulsen, L. K., Jacobi, H. H., and Malling, H. J. (2002). The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 57, 297-305.
- Boguniewicz, M., Martin, R. J., Martin, D., Gibson, U., Celniker, A., Williams, M., and Leung, D. Y. (1995). The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 95, 133-135.
- Bohle, B., Kinaciyan, T., Gerstmayr, M., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., and Ebner, C. (2007). Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 120, 707-713.
- Borish, L., Aarons, A., Rumblyrt, J., Cvietusa, P., Negri, J., and Wenzel, S. (1996). Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1288-1296.
- Bousquet, J., Lockey, R., and Malling, H. J. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 102, 558-562.
- Bousquet, P. J., Chinn, S., Janson, C., Kogevinas, M., Burney, P., and Jarvis, D. (2007). Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* 62, 301-309.
- Broide, D. H. (2001). Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 108, S65-71.
- Brown, J. M., Wilson, T. M., and Metcalfe, D. D. (2008). The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* 38, 4-18.
- Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J. H., van der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A., and Bluethmann, H. (1994). Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 24, 73-80.
- Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M., and Becker, W. M. (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 199, 413-415.
- Bullens, D. M., De Swert, A., Dilissen, E., Kasran, A., Krocze, R. A., Cadot, P., Casaer, P., and Ceuppens, J. L. (2005). House dust mite-specific T cells in healthy non-atopic children. *Clin Exp Allergy* 35, 1535-1541.
- Calderon, M. A., Alves, B., Jacobson, M., Hurwitz, B., Sheikh, A., and Durham, S. (2007). Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001936.
- Canonica, G. W., Baena-Cagnani, C. E., Bousquet, J., Bousquet, P. J., Lockey, R. F., Malling, H. J., Passalacqua, G., Potter, P., and Valovirta, E. (2007). Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory

- allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 62, 317-324.
- Cazac, B. B., and Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13, 443-451.
- Challacombe, S. J., and Tomasi, T. B., Jr. (1980). Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med* 152, 1459-1472.
- Chang, T. W. (2000). The pharmacological basis of anti-IgE therapy. *Nat Biotechnol* 18, 157-162.
- Chatila, T. A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H. M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A. M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106, R75-81.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Clutterbuck, E. J., Hirst, E. M., and Sanderson, C. J. (1989). Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73, 1504-1512.
- Cobbold, S. P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 172, 6003-6010.
- Cohen, S. G., Frankland, A. W., and Dworetzky, M. (2003). Noon and Freeman on prophylactic inoculation against hay fever. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1142-1150.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F., and Berneman, Z. N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195.
- Coombs, R. R. A., and Gell, P. H. G. (1975). Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications.
- Creticos, P. S., Chen, Y. H., and Schroeder, J. T. (2004). New approaches in immunotherapy: allergen vaccination with immunostimulatory DNA. *Immunol Allergy Clin North Am* 24, 569-581.
- Curotto de Lafaille, M. A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J. J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29, 114-126.
- Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30, 626-635.
- Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. (2004). CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 173, 7259-7268.
- Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L., and Ouchterlony, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 110, 29-36.

- D'Amato, G., Bonini, S., Bousquet, J., Durham, S. R., and Platts-Mills, T. A. E. (2001). *Pollenosis 2000: Global Approach*. JGC Editions, Naples, Italy.
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., and van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62, 976-990.
- D'Amato, G., Spieksma, F. T., Liccardi, G., Jager, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wuthrich, B., and Bonini, S. (1998). Pollen-related allergy in Europe. *Allergy* 53, 567-578.
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., De Vries, J., and Romagnani, S. (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 140, 4193-4198.
- Del Prete, G. F., De Carli, M., D'Elia, M. M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L., and Romagnani, S. (1993). Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 23, 1445-1449.
- Des Roches, A., Paradis, L., Menardo, J. L., Bouges, S., Daures, J. P., and Bousquet, J. (1997). Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 99, 450-453.
- Devadas, S., Das, J., Liu, C., Zhang, L., Roberts, A. I., Pan, Z., Moore, P. A., Das, G., and Shi, Y. (2006). Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* 25, 237-247.
- Devos, S., Cormont, F., Vrtala, S., Hooghe-Peters, E., Pirson, F., and Snick, J. (2006). Allergen-induced interleukin-9 production in vitro: correlation with atopy in human adults and comparison with interleukin-5 and interleukin-13. *Clin Exp Allergy* 36, 174-182.
- Dieckmann, D., Bruett, C. H., Ploettner, H., Lutz, M. B., and Schuler, G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 196, 247-253.
- Djuretic, I. M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K. M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8, 145-153.
- Doetze, A., Satoguina, J., Burchard, G., Rau, T., Loliger, C., Fleischer, B., and Hoerauf, A. (2000). Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* 12, 623-630.
- Dolz, I., Martinez-Cocera, C., Bartolome, J. M., and Cimarra, M. (1996). A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with grass-pollen extract Alutard SQ during a 3-year period with initial rush immunotherapy. *Allergy* 51, 489-500.
- Douglass, J. A., and O'Hehir, R. E. (2006). 1. Diagnosis, treatment and prevention of allergic disease: the basics. *Med J Aust* 185, 228-233.

- Downs, S. H., Marks, G. B., Mitakakis, T. Z., Leuppi, J. D., Car, N. G., and Peat, J. K. (2001). Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia. *Clin Exp Allergy* 31, 570-575.
- Drachenberg, K. J., Wheeler, A. W., Stuebner, P., and Horak, F. (2001). A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy* 56, 498-505.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10, 857-863.
- Durham, S. R., Gould, H. J., and Hamid, Q. A. (1997). Local IgE production in nasal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 128-130.
- Durham, S. R., and Till, S. J. (1998). Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 102, 157-164.
- Durham, S. R., Varney, V., Gaga, M., Frew, A. J., Jacobson, M., and Kay, A. B. (1991). Immunotherapy and allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 21 Suppl 1, 206-210.
- Durham, S. R., Varney, V. A., Gaga, M., Jacobson, M. R., Varga, E. M., Frew, A. J., and Kay, A. B. (1999a). Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin. *Clin Exp Allergy* 29, 1490-1496.
- Durham, S. R., Walker, S. M., Varga, E. M., Jacobson, M. R., O'Brien, F., Noble, W., Till, S. J., Hamid, Q. A., and Nouri-Aria, K. T. (1999b). Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N Engl J Med* 341, 468-475.
- Eastmond, N. C., Banks, E. M., and Coleman, J. W. (1997). Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. *J Immunol* 159, 1444-1450.
- Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1997). Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 27, 1007-1015.
- Ejrnaes, A. M., Svenson, M., Lund, G., Larsen, J. N., and Jacobi, H. (2006). Inhibition of rBet v 1-induced basophil histamine release with specific immunotherapy -induced serum immunoglobulin G: no evidence that FcgammaRIIB signalling is important. *Clin Exp Allergy* 36, 273-282.
- Elkord, E. (2009). Frequency of human T regulatory cells in peripheral blood is significantly reduced by cryopreservation. *J Immunol Methods* 347, 87-90.
- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H., and Li-Weber, M. (2002). IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17, 703-712.
- Eriksson, N. E., and Holmen, A. (1996). Skin prick tests with standardized extracts of inhalant allergens in 7099 adult patients with asthma or rhinitis: cross-sensitizations and

- relationships to age, sex, month of birth and year of testing. *J Investig Allergol Clin Immunol* 6, 36-46.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 119, 3573-3585.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149-5153.
- Faria, A. M., and Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev* 206, 232-259.
- Feijen, M., Gerritsen, J., and Postma, D. S. (2000). Genetics of allergic disease. *Br Med Bull* 56, 894-907.
- Fennerty, A. G., Jones, K. P., Davies, B. H., Fifield, R., and Edwards, J. (1988). Immunological changes associated with a successful outcome of pollen immunotherapy. *Allergy* 43, 415-419.
- Ferrer, M., Burches, E., Pelaez, A., Munoz, A., Hernandez, D., Basomba, A., Enrique, E., Alonso, R., Cistero-Bahima, A., Martin, S., et al. (2005). Double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with *Parietaria judaica*: clinical efficacy and tolerance. *J Investig Allergol Clin Immunol* 15, 283-292.
- Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green, F. H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P. R., Szabo, S. J., et al. (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295, 336-338.
- Flicker, S., and Valenta, R. (2003). Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 132, 13-24.
- Florido, J. F., Delgado, P. G., de San Pedro, B. S., Quiralte, J., de Saavedra, J. M., Peralta, V., and Valenzuela, L. R. (1999). High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol* 119, 133-137.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Francis, J. N., Till, S. J., and Durham, S. R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1255-1261.
- Frew, A. J. (2008). Sublingual immunotherapy. *N Engl J Med* 358, 2259-2264.
- Frew, A. J., Powell, R. J., Corrigan, C. J., and Durham, S. R. (2006). Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 117, 319-325.
- Gabrielsson, S., Paulie, S., Roquet, A., Ihre, E., Lagging, E., van Hage-Hamsten, M., Harfast, B., and Troye-Blomberg, M. (1997). Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge. *Allergy* 52, 860-865.
- Gafvelin, G., Thunberg, S., Kronqvist, M., Gronlund, H., Gronneberg, R., Troye-Blomberg, M., Akdis, M., Fiebig, H., Purohit, A., Horak, F., et al. (2005). Cytokine and antibody

- responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1. *Int Arch Allergy Immunol* 138, 59-66.
- Gardner, L. M., O'Hehir, R. E., and Rolland, J. M. (2004). High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN-gamma+ T Cells, apoptosis of CD4+IL-4+ T cells and T cell anergy. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 1-13.
- Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U., and Presky, D. H. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 495-521.
- Gehlhar, K., Schlaak, M., Becker, W., and Bufe, A. (1999). Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy* 29, 497-506.
- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R. A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med* 195, 1499-1505.
- Gorelik, L., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol* 165, 4773-4777.
- Gould, H. J., and Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8, 205-217.
- Grammer, L. C., Zeiss, C. R., Suszko, I. M., Shaughnessy, M. A., and Patterson, R. (1982). A double-blind, placebo-controlled trial of polymerized whole ragweed for immunotherapy of ragweed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 69, 494-499.
- Grevers, G., and Röcken, M. (2008). *Taschenatlas Allergologie* (2. Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Grindebacke, H., Larsson, P., Wing, K., Rak, S., and Rudin, A. (2009). Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season. *J Clin Immunol* 29, 752-760.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3, 1097-1101.
- Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M. L., Ayroldi, E., Nocentini, G., et al. (2007). Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* 13, 579-586.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 19-29.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Guerra, F., Carracedo, J., Solana-Lara, R., Sanchez-Guijo, P., and Ramirez, R. (2001). TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol* 107, 647-653.
- Guilbert, T. W., Morgan, W. J., Zeiger, R. S., Mauger, D. T., Boehmer, S. J., Szeffler, S. J., Bacharier, L. B., Lemanske, R. F., Jr., Strunk, R. C., Allen, D. B., et al. (2006). Long-term

- inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. *N Engl J Med* 354, 1985-1997.
- Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F., and Suerbaum, S. (2008). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (6. Auflage). Springer Verlag.
- Hamelmann, E., Rolinck-Werninghaus, C., and Wahn, U. (2002). From IgE to anti-IgE: where do we stand? *Allergy* 57, 983-994.
- Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Bradley, B., Durham, S. R., Collins, J. V., Jeffery, P. K., and et al. (1991). Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 87, 1541-1546.
- Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (1999). Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103, 175-183.
- Harris, J. R., Magnus, P., Samuelsen, S. O., and Tambs, K. (1997). No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 43-49.
- Heath, V. L., Murphy, E. E., Crain, C., Tomlinson, M. G., and O'Garra, A. (2000). TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 30, 2639-2649.
- Hiepe, F., and Dorner, T. (2005). [Autoantibodies and antibody-secreting cells]. *Z Rheumatol* 64, 389-395.
- Hofmeister, R., Khaled, A. R., Benbernou, N., Rajnavolgyi, E., Muegge, K., and Durum, S. K. (1999). Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 41-60.
- Holgate, S. T., Djukanovic, R., Casale, T., and Bousquet, J. (2005). Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. *Clin Exp Allergy* 35, 408-416.
- Holgate, S. T., and Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8, 218-230.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Huber, B. (2006). [100 years of allergy: Clemens von Pirquet - his idea of allergy and its immanent concept of disease]. *Wien Klin Wochenschr* 118, 573-579.
- Huber, S., and Schramm, C. (2006). TGF-beta and CD4+CD25+ regulatory T cells. *Front Biosci* 11, 1014-1023.
- Imada, M., Simons, F. E., Jay, F. T., and Hayglass, K. T. (1995). Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls. *Immunology* 85, 373-380.

- Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M. M. (1966a). Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 97, 75-85.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M. M. (1966b). Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 97, 840-853.
- Jacobsen, L., Niggemann, B., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Host, A., Koivikko, A., Norberg, L. A., Valovirta, E., Wahn, U., and Moller, C. (2007). Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 62, 943-948.
- Jacobsen, L., Nuchel Petersen, B., Wihl, J. A., Lowenstein, H., and Ipsen, H. (1997). Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. IV. Results from long-term (6-year) follow-up. *Allergy* 52, 914-920.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2002). *Immunologie* (5. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Janssen, O., Stocker, A., Sanzenbacher, R., Oberg, H. H., Siddiqi, M. A., and Kabelitz, D. (2000). Differential regulation of activation-induced cell death in individual human T cell clones. *Int Arch Allergy Immunol* 121, 183-193.
- Jardieu, P. M., and Fick, R. B., Jr. (1999). IgE inhibition as a therapy for allergic disease. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 112-115.
- Jarnicki, A. G., and Fallon, P. G. (2003). T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 3, 449-455.
- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A. T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O., and Kraft, D. (1989). IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 44, 385-395.
- Jeannin, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J. F., and Bonnefoy, J. Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 160, 3555-3561.
- Johansson, S. G., and Bennich, H. (1967). Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 13, 381-394.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A. H. (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196, 255-260.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.
- Jutel, M., Akdis, M., Blaser, K., and Akdis, C. A. (2006). Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy* 61, 796-807.
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., and Akdis, C. A. (2003). IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 33, 1205-1214.

- Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., and Cromwell, O. (2005). Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 116, 608-613.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., and Muller, U. R. (1995). Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154, 4187-4194.
- Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J. E., Zhang, J., Siraganian, R. P., and Krystal, G. (2001). Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 14, 801-811.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., and Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P. Y., Menz, G., Akdis, C. A., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C. B. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114, 1425-1433.
- Karamloo, F., Schmitz, N., Scheurer, S., Foetisch, K., Hoffmann, A., Hausteil, D., and Vieths, S. (1999). Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 104, 991-999.
- Karlsson, M. R., Rugtveit, J., and Brandtzaeg, P. (2004). Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 199, 1679-1688.
- Karmaus, W., and Botezan, C. (2002). Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review. *J Epidemiol Community Health* 56, 209-217.
- Kawano, Y., Noma, T., and Yata, J. (1994). Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol* 153, 4948-4958.
- Keskin, O., Tuncer, A., Adalioglu, G., Sekerel, B. E., Sackesen, C., and Kalayci, O. (2006). The effects of grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 396-407.
- Khatti, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Kimura, I., Tanizaki, Y., Goda, Y., Komagoe, H., and Kitani, H. (1985). Decrease in reactivity of basophils by immunotherapy with housedust extract. *Clin Allergy* 15, 1-7.
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., and Thomas, W. (1994). Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 224-233.
- Kisselgof, A. B., and Oettgen, H. C. (1998). The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE. *Int Immunol* 10, 1377-1384.

- Kleine-Tebbe, J., Bachert, C., Bergmann, K. C., Bieber, T., Brehler, R., Friedrichs, F., Fuchs, T., Klimek, L., Kopp, M. V., Lepp, U., et al. (2007). Aktueller Stellenwert der sublingualen Immuntherapie bei allergischen Krankheiten. *Allergo J* 16, 492-500.
- Kleine-Tebbe, J., Bufe, A., Ebner, C., Eigenmann, P., Friedrichs, F., Fuchs, T., Huttegger, I., Jung, K., Klimek, L., Kopp, M., et al. (2009). Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen. *Allergo J* 18, 508-537.
- Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T., and Sakaguchi, S. (2005). Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 202, 885-891.
- Kohm, A. P., Williams, J. S., and Miller, S. D. (2004). Cutting edge: ligation of the glucocorticoid-induced TNF receptor enhances autoreactive CD4+ T cell activation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172, 4686-4690.
- Kopp, M. V., Brauburger, J., Riedinger, F., Beischer, D., Ihorst, G., Kamin, W., Zielen, S., Bez, Friedrichs, F., Von Berg, A., et al. (2002). The effect of anti-IgE treatment on in vitro leukotriene release in children with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 110, 728-735.
- Lagier, B., Pons, N., Rivier, A., Chanal, I., Chanez, P., Bousquet, J., and Pene, J. (1995). Seasonal variations of interleukin-4 and interferon-gamma release by peripheral blood mononuclear cells from atopic subjects stimulated by polyclonal activators. *J Allergy Clin Immunol* 96, 932-940.
- Larche, M. (2007). Update on the current status of peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119, 906-909.
- Leonard, C., Tormey, V., Burke, C., and Poulter, L. W. (1997). Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 368-375.
- Lesso, M. H., Sobotka, A. K., and Lichtenstein, L. M. (1978). Effects of passive antibody in bee venom anaphylaxis. *Johns Hopkins Med J* 142, 1-7.
- Letterio, J. J., and Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16, 137-161.
- Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169.
- Lichtenstein, L. M., Holtzman, N. A., and Burnett, L. S. (1968). A quantitative in vitro study of the chromatographic distribution and immunoglobulin characteristics of human blocking antibody. *J Immunol* 101, 317-324.
- Lin, W., Truong, N., Grossman, W. J., Haribhai, D., Williams, C. B., Wang, J., Martin, M. G., and Chatila, T. A. (2005). Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol* 116, 1106-1115.

- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. (2004). Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608-615.
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.
- London, S. J., James Gauderman, W., Avol, E., Rappaport, E. B., and Peters, J. M. (2001). Family history and the risk of early-onset persistent, early-onset transient, and late-onset asthma. *Epidemiology* 12, 577-583.
- Lund, L., Henmar, H., Wurtzen, P. A., Lund, G., Hjortskov, N., and Larsen, J. N. (2007). Comparison of allergenicity and immunogenicity of an intact allergen vaccine and commercially available allergoid products for birch pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 37, 564-571.
- Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Smith, C. I., Hammarstrom, L., and Severinson, E. (1989). Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 19, 1311-1315.
- Luttmann, W., Dauer, E., Schmidt, S., Marx, O., Hossfeld, M., Matthys, H., and Virchow, J. C., Jr. (2000). Effects of interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on CD95/Fas ligand-mediated apoptosis in human blood eosinophils. *Scand J Immunol* 51, 54-59.
- Macfarlane, A. J., Kon, O. M., Smith, S. J., Zeibecoglou, K., Khan, L. N., Barata, L. T., McEuen, A. R., Buckley, M. G., Walls, A. F., Meng, Q., et al. (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 105, 99-107.
- Majkowska-Wojciechowska, B., Pelka, J., Korzon, L., Kozłowska, A., Kaczala, M., Jarzebska, M., Gwardys, T., and Kowalski, M. L. (2007). Prevalence of allergy, patterns of allergic sensitization and allergy risk factors in rural and urban children. *Allergy* 62, 1044-1050.
- Mantel, P. Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B. N., Hendriks, R. W., Cramer, R., et al. (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5, e329.
- Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., and Rudensky, A. Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.
- Marshall, J. D., Wen, Y., Abrams, J. S., and Umetsu, D. T. (1993). In vitro synthesis of IL-4 by human CD4+ T cells requires repeated antigenic stimulation. *Cell Immunol* 152, 18-34.
- McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., et al. (1997). A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods* 210, 149-166.

- McHugh, S. M., Deighton, J., Stewart, A. G., Lachmann, P. J., and Ewan, P. W. (1995). Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 25, 828-838.
- McLane, M. P., Haczku, A., van de Rijn, M., Weiss, C., Ferrante, V., MacDonald, D., Renauld, J. C., Nicolaides, N. C., Holroyd, K. J., and Levitt, R. C. (1998). Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 713-720.
- Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A., and Akdis, M. (2008a). Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 63, 1455-1463.
- Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C. A., and Akdis, M. (2008b). In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 205, 2887-2898.
- Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.
- Menz, G., Dolecek, C., Schonheit-Kenn, U., Ferreira, F., Moser, M., Schneider, T., Suter, M., Boltz-Nitulescu, G., Ebner, C., Kraft, D., and Valenta, R. (1996). Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 26, 50-60.
- Minai-Fleminger, Y., and Levi-Schaffer, F. (2009). Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* 58, 631-638.
- Mirone, C., Albert, F., Tosi, A., Mocchetti, F., Mosca, S., Giorgino, M., Pecora, S., Parmiani, S., and Ortolani, C. (2004). Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with a biologically standardized extract of *Ambrosia artemisiifolia* pollen: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy* 34, 1408-1414.
- Möbs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Pfützner, W., and Hertl, M. (2008). Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 147, 171-178.
- Modigliani, Y., Bandeira, A., and Coutinho, A. (1996). A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens. *Immunol Rev* 149, 155-120.
- Moller, C., Dreborg, S., and Einarsson, R. (1987). Immunotherapy to deciduous tree pollens: specific IgE and IgG antibody patterns. *Clin Allergy* 17, 551-562.
- Moller, C., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Host, A., Jacobsen, L., Koivikko, A., Koller, D. Y., Niggemann, B., Norberg, L. A., et al. (2002). Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J Allergy Clin Immunol* 109, 251-256.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.

- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Mosmann, T. R., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17, 138-146.
- Mothes, N., Heinzkill, M., Drachenberg, K. J., Sperr, W. R., Krauth, M. T., Majlesi, Y., Semper, H., Valent, P., Niederberger, V., Kraft, D., and Valenta, R. (2003). Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 33, 1198-1208.
- Mothes, N., and Valenta, R. (2004). Biology of tree pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 4, 384-390.
- Moverare, R., Elfman, L., Bjornsson, E., and Stalenheim, G. (2000). Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy. *Immunol Lett* 73, 51-56.
- Moverare, R., Rak, S., and Elfman, L. (1998). Allergen-specific increase in interleukin (IL)-4 and IL-5 secretion from peripheral blood mononuclear cells during birch-pollen immunotherapy. *Allergy* 53, 275-281.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J. J., and Curotto de Lafaille, M. A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115, 1923-1933.
- Mueller, D. L., Jenkins, M. K., Chiodetti, L., and Schwartz, R. H. (1990). An intracellular calcium increase and protein kinase C activation fail to initiate T cell proliferation in the absence of a costimulatory signal. *J Immunol* 144, 3701-3709.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Muller, U., Akdis, C. A., Fricker, M., Akdis, M., Blesken, T., Bettens, F., and Blaser, K. (1998). Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 101, 747-754.
- Munoz, N. M., and Leff, A. R. (2006). Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nat Protoc* 1, 2613-2620.
- Niederberger, V., Horak, F., Vrtala, S., Spitzauer, S., Krauth, M. T., Valent, P., Reisinger, J., Pelzmann, M., Hayek, B., Kronqvist, M., et al. (2004). Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14677-14682.
- Niederberger, V., Niggemann, B., Kraft, D., Spitzauer, S., and Valenta, R. (2002). Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4) antibody responses in early childhood monitored with recombinant

- allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol* 32, 576-584.
- Niggemann, B., Jacobsen, L., Dreborg, S., Ferdousi, H. A., Halken, S., Host, A., Koivikko, A., Koller, D., Norberg, L. A., Urbanek, R., et al. (2006). Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *Allergy* 61, 855-859.
- Nocentini, G., and Riccardi, C. (2005). GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 35, 1016-1022.
- Nouri-Aria, K. T., Wachholz, P. A., Francis, J. N., Jacobson, M. R., Walker, S. M., Wilcock, L. K., Staple, S. Q., Aalberse, R. C., Till, S. J., and Durham, S. R. (2004). Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 172, 3252-3259.
- Novembre, E., Galli, E., Landi, F., Caffarelli, C., Pifferi, M., De Marco, E., Burastero, S. E., Calori, G., Benetti, L., Bonazza, P., et al. (2004). Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 114, 851-857.
- O'Brien, R. M., Byron, K. A., Varigos, G. A., and Thomas, W. R. (1997). House dust mite immunotherapy results in a decrease in Der p 2-specific IFN-gamma and IL-4 expression by circulating T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 27, 46-51.
- Oboki, K., Ohno, T., Saito, H., and Nakae, S. (2008). Th17 and allergy. *Allergol Int* 57, 121-134.
- Olsson, T., Zhi, W. W., Hojeberg, B., Kostulas, V., Jiang, Y. P., Anderson, G., Ekre, H. P., and Link, H. (1990). Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 86, 981-985.
- Ozdemir, C., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2009). T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin Exp Allergy* 39, 626-639.
- Ozdemir, C., Yazici, D., Gocmen, I., Yesil, O., Aydogan, M., Semic-Jusufagic, A., Bahceciler, N. N., and Barlan, I. B. (2007). Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 18, 508-515.
- Pajno, G. B., Barberio, G., De Luca, F., Morabito, L., and Parmiani, S. (2001). Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 31, 1392-1397.
- Palframan, R. T., Collins, P. D., Severs, N. J., Rothery, S., Williams, T. J., and Rankin, S. M. (1998). Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med* 188, 1621-1632.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinini, M. P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A. A., and Romagnani, S. (1991). Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4538-4542.

- Passalacqua, G., and Canonica, G. W. (2002). Long-lasting clinical efficacy of allergen specific immunotherapy. *Allergy* 57, 275-276.
- Pereira-Santos, M. C., Baptista, A. P., Melo, A., Alves, R. R., Soares, R. S., Pedro, E., Pereira-Barbosa, M., Victorino, R. M., and Sousa, A. E. (2008). Expansion of circulating Foxp3+D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 38, 291-297.
- Pierkes, M., Bellinghausen, I., Hultsch, T., Metz, G., Knop, J., and Saloga, J. (1999). Decreased release of histamine and sulfidoleukotrienes by human peripheral blood leukocytes after wasp venom immunotherapy is partially due to induction of IL-10 and IFN-gamma production of T cells. *J Allergy Clin Immunol* 103, 326-332.
- Pilette, C., Nouri-Aria, K. T., Jacobson, M. R., Wilcock, L. K., Detry, B., Walker, S. M., Francis, J. N., and Durham, S. R. (2007). Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *J Immunol* 178, 4658-4666.
- Platts-Mills, T., Vaughan, J., Squillace, S., Woodfolk, J., and Sporik, R. (2001). Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357, 752-756.
- Platts-Mills, T. A. (2001). The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S1-5.
- Platts-Mills, T. A., and Cooper, P. J. (2010). Differences in asthma between rural and urban communities in South Africa and other developing countries. *J Allergy Clin Immunol* 125, 106-107.
- Plewako, H., Arvidsson, M., Petruson, K., Oancea, I., Holmberg, K., Adelroth, E., Gustafsson, H., Sandstrom, T., and Rak, S. (2002). The effect of omalizumab on nasal allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 110, 68-71.
- Polosa, R., Al-Delaimy, W. K., Russo, C., Piccillo, G., and Sarva, M. (2005). Greater risk of incident asthma cases in adults with allergic rhinitis and effect of allergen immunotherapy: a retrospective cohort study. *Respir Res* 6, 153.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., and de Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3730-3734.
- Purello-D'Ambrosio, F., Gangemi, S., Merendino, R. A., Isola, S., Puccinelli, P., Parmiani, S., and Ricciardi, L. (2001). Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin Exp Allergy* 31, 1295-1302.
- Qin, S., Cobbold, S. P., Pope, H., Elliott, J., Kioussis, D., Davies, J., and Waldmann, H. (1993). "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259, 974-977.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E. O., Inamine, A., Smith, K. G., Dorner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6, 741-750.

- Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R., and Nouri-Aria, K. T. (2008). Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1467-1472, 1472 e1461.
- Rak, S., Heinrich, C., Jacobsen, L., Scheynius, A., and Venge, P. (2001). A double-blinded, comparative study of the effects of short pre-season specific immunotherapy and topical steroids in patients with allergic rhinoconjunctivitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, 921-928.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S. I., and Abbas, A. K. (2002). Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* 196, 999-1005.
- Renzi, P. M., Turgeon, J. P., Marcotte, J. E., Drblik, S. P., Berube, D., Gagnon, M. F., and Spier, S. (1999). Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1417-1422.
- Riechelmann, H., Bachert, C., Goldschmidt, O., Hauswald, B., Klimek, L., Schlenter, W. W., Tasman, A. J., and Wagenmann, M. (2003). [Application of the nasal provocation test on diseases of the upper airways. Position paper of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (ENT Section) in cooperation with the Working Team for Clinical Immunology]. *Laryngorhinootologie* 82, 183-188.
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., and von Mutius, E. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129-1133.
- Ring, J., Kramer, U., Schafer, T., and Behrendt, H. (2001). Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 13, 701-708.
- Rodriguez, J., Crespo, J. F., Lopez-Rubio, A., De La Cruz-Bertolo, J., Ferrando-Vivas, P., Vives, R., and Daroca, P. (2000). Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *J Allergy Clin Immunol* 106, 183-189.
- Roesler, E., Weiss, R., Weinberger, E. E., Fruehwirth, A., Stoecklinger, A., Mostböck, S., Ferreira, F., Thalhamer, J., and Scheibelhofer, S. (2009). Immunize and disappear-safety-optimized mRNA vaccination with a panel of 29 allergens. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1070-1077 e1071-1011.
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12, 227-257.
- Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400.
- Romagnani, S. (2006). Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36, 1357-1366.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.
- Rossi, R. E., Monasterolo, G., Coco, G., Silvestro, L., and Operti, D. (2007). Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. *Vaccine* 25, 957-964.

- Royer, B., Varadaradjalou, S., Saas, P., Guillosson, J. J., Kantelip, J. P., and Arock, M. (2001). Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 31, 694-704.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sanderson, C. J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-3109.
- Satoguina, J. S., Adjibimey, T., Arndts, K., Hoch, J., Oldenburg, J., Layland, L. E., and Hoerauf, A. (2008). Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. *Eur J Immunol* 38, 3101-3113.
- Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J., and Hoerauf, A. (2005). T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 174, 4718-4726.
- Schandene, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., and Goldman, M. (1994). B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 152, 4368-4374.
- Schmidt-Weber, C. B., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2007). TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 120, 247-254.
- Schmidt-Weber, C. B., and Blaser, K. (2004). Regulation and role of transforming growth factor-beta in immune tolerance induction and inflammation. *Curr Opin Immunol* 16, 709-716.
- Scholl, I., Kopp, T., Bohle, B., and Jensen-Jarolim, E. (2006). Biodegradable PLGA particles for improved systemic and mucosal treatment of Type I allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 26, 349-364.
- Schuurman, J., Van Ree, R., Perdok, G. J., Van Doorn, H. R., Tan, K. Y., and Aalberse, R. C. (1999). Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites. *Immunology* 97, 693-698.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-334.
- Secrist, H., Chelen, C. J., Wen, Y., Marshall, J. D., and Umetsu, D. T. (1993). Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178, 2123-2130.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203, 1693-1700.
- Senna, G., Ridolo, E., Calderon, M., Lombardi, C., Canonica, G. W., and Passalacqua, G. (2009). Evidence of adherence to allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9, 544-548.
- Senti, G., Graf, N., Haug, S., Ruedi, N., von Moos, S., Sonderegger, T., Johansen, P., and Kundig, T. M. (2009). Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 124, 997-1002.

- Senti, G., Prinz Vavricka, B. M., Erdmann, I., Diaz, M. I., Markus, R., McCormack, S. J., Simard, J. J., Wuthrich, B., Cramer, R., Graf, N., et al. (2008). Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17908-17912.
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L., and Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev* 212, 60-73.
- Shevach, E. M., and Stephens, G. L. (2006). The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 6, 613-618.
- Shim, J. Y., Kim, B. S., Cho, S. H., Min, K. U., and Hong, S. J. (2003). Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy* 33, 52-57.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.
- Shreffler, W. G., Wanich, N., Moloney, M., Nowak-Wegrzyn, A., and Sampson, H. A. (2009). Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J Allergy Clin Immunol* 123, 43-52 e47.
- Smith, S. J., Piliponsky, A. M., Rosenhead, F., Elchalal, U., Nagler, A., and Levi-Schaffer, F. (2002). Dexamethasone inhibits maturation, cytokine production and Fc epsilon RI expression of human cord blood-derived mast cells. *Clin Exp Allergy* 32, 906-913.
- Snijders, A., Kalinski, P., Hilken, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 10, 1593-1598.
- Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9, 310-318.
- Soroosh, P., and Doherty, T. A. (2009). Th9 and allergic disease. *Immunology* 127, 450-458.
- Stassen, M., Jonuleit, H., Muller, C., Klein, M., Richter, C., Bopp, T., Schmitt, S., and Schmitt, E. (2004). Differential regulatory capacity of CD25⁺ T regulatory cells and preactivated CD25⁺ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells. *J Immunol* 173, 267-274.
- Stephens, G. L., McHugh, R. S., Whitters, M. J., Young, D. A., Luxenberg, D., Carreno, B. M., Collins, M., and Shevach, E. M. (2004). Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 173, 5008-5020.
- Stern, D. A., Riedler, J., Nowak, D., Braun-Fahrlander, C., Swoboda, I., Balic, N., Chen, K. W., Vrtala, S., Gronlund, H., van Hage, M., et al. (2007). Exposure to a farming environment has allergen-specific protective effects on TH2-dependent isotype switching in response to common inhalants. *J Allergy Clin Immunol* 119, 351-358.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 299, 1259-1260.

- Strait, R. T., Morris, S. C., and Finkelman, F. D. (2006). IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. *J Clin Invest* 116, 833-841.
- Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P., and Mosser, D. M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med* 188, 217-222.
- Szabo, S. J., Dighe, A. S., Gubler, U., and Murphy, K. M. (1997). Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185, 817-824.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., and Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21, 713-758.
- Teixeira, L. K., Fonseca, B. P., Barboza, B. A., and Viola, J. P. (2005). The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 137-144.
- Thieu, V. T., Yu, Q., Chang, H. C., Yeh, N., Nguyen, E. T., Sehra, S., and Kaplan, M. H. (2008). Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29, 679-690.
- Thunberg, S., Akdis, M., Akdis, C. A., Gronneberg, R., Malmstrom, V., Trollmo, C., van Hage, M., and Gafvelin, G. (2007). Immune regulation by CD4+CD25+ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 37, 1127-1136.
- Tiemessen, M. M., Van Hoffen, E., Knulst, A. C., Van Der Zee, J. A., Knol, E. F., and Taams, L. S. (2002). CD4 CD25 regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 110, 934-936.
- Till, S., Walker, S., Dickason, R., Huston, D., O'Brien, F., Lamb, J., Kay, A. B., Corrigan, C., and Durham, S. (1997). IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Immunol* 110, 114-121.
- Torgerson, T. R. (2006). Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Semin Immunopathol* 28, 63-76.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., and Behrendt, H. (2009). Determinants of allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 123, 558-566.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M. J., Jakob, T., and Behrendt, H. (2005). Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med* 201, 627-636.
- Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J., and Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203, 755-766.
- Valenta, R., Breiteneder, H., Petternburger, K., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1991). Homology of the major birch-pollen allergen, Bet v I, with the major

- pollen allergens of alder, hazel, and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. *J Allergy Clin Immunol* 87, 677-682.
- Valenta, R., and Niederberger, V. (2007). Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119, 826-830.
- Valovirta, E., Jacobsen, L., Ljorring, C., Koivikko, A., and Savolainen, J. (2006). Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. *Allergy* 61, 1177-1183.
- van der Veen, M. J., Mulder, M., Witteman, A. M., van Ree, R., Aalberse, R. C., Jansen, H. M., and van der Zee, J. S. (1996). False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol* 98, 1028-1034.
- van der Zee, J. S., van Swieten, P., and Aalberse, R. C. (1986). Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol* 64, 415-422.
- van Neerven, R. J., Wikborg, T., Lund, G., Jacobsen, B., Brinch-Nielsen, A., Arnved, J., and Ipsen, H. (1999). Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol* 163, 2944-2952.
- Van Overtvelt, L., Wambre, E., Maillere, B., von Hofe, E., Louise, A., Balazuc, A. M., Bohle, B., Ebo, D., Leboulle, C., Garcia, G., and Moingeon, P. (2008). Assessment of Bet v 1-specific CD4+ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol* 180, 4514-4522.
- Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.
- Van Ree, R., Van Leeuwen, W. A., Dieges, P. H., Van Wijk, R. G., De Jong, N., Brewczynski, P. Z., Kroon, A. M., Schilte, P. P., Tan, K. Y., Simon-Licht, I. F., et al. (1997). Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 27, 68-74.
- van Ree, R., and Yazdanbakhsh, M. (2007). Allergic disorders in African countries: linking immunology to accurate phenotype. *Allergy* 62, 237-246.
- Varney, V. A., Gaga, M., Frew, A. J., Aber, V. R., Kay, A. B., and Durham, S. R. (1991). Usefulness of immunotherapy in patients with severe summer hay fever uncontrolled by antiallergic drugs. *Bmj* 302, 265-269.
- Venkataraman, C., Leung, S., Salvekar, A., Mano, H., and Schindler, U. (1999). Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J Immunol* 162, 4053-4061.
- Vieira, P. L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E. J., Barrat, F. J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D. C., and O'Garra, A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172, 5986-5993.
- Vieths, S., Scheurer, S., and Ballmer-Weber, B. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 964, 47-68.

- Visco, V., Dolecek, C., Denepoux, S., Le Mao, J., Guret, C., Rousset, F., Guinépain, M. T., Kraft, D., Valenta, R., Weyer, A., et al. (1996). Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J Immunol* 157, 956-962.
- von Mutius, E., Martinez, F. D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Reitmeir, P., and Thiemann, H. H. (1994). Skin test reactivity and number of siblings. *Bmj* 308, 692-695.
- Wachholz, P. A., and Durham, S. R. (2004). Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4, 313-318.
- Wachholz, P. A., Soni, N. K., Till, S. J., and Durham, S. R. (2003). Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 112, 915-922.
- Walker, S. M., Varney, V. A., Gaga, M., Jacobson, M. R., and Durham, S. R. (1995). Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy* 50, 405-413.
- Wang, H., Barrenas, F., Bruhn, S., Mobini, R., and Benson, M. (2009). Increased IFN-gamma activity in seasonal allergic rhinitis is decreased by corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1360-1362.
- Weber, R. W. (2003). White birch. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91, A-6.
- Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., al-Sabbagh, A., Santos, L., Sayegh, M., Nussenblatt, R. B., Trentham, D. E., and Hafler, D. A. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 12, 809-837.
- Werfel, T. (2009). Epicutaneous allergen administration: a novel approach for allergen-specific immunotherapy? *J Allergy Clin Immunol* 124, 1003-1004.
- Wheeler, A. (2006). A novel adjuvant complex, tyrosine-MPL, for prophylactic and therapeutic vaccines. *Vaccine* 24 Suppl 2, S2-40-41.
- Wilczynski, J. R., Radwan, M., and Kalinka, J. (2008). The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci* 13, 2266-2274.
- Williams, A. P., Krishna, M. T., and Frew, A. J. (2004). The safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 34, 513-514.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C. L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1, 69-75.
- Wilson, D. R., Irani, A. M., Walker, S. M., Jacobson, M. R., Mackay, I. S., Schwartz, L. B., and Durham, S. R. (2001). Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy* 31, 1705-1713.
- Wolf, H. M., Vogel, E., Fischer, M. B., Rengs, H., Schwarz, H. P., and Eibl, M. M. (1994). Inhibition of receptor-dependent and receptor-independent generation of the respiratory burst in human neutrophils and monocytes by human serum IgA. *Pediatr Res* 36, 235-243.

- Woodcock, A., Lowe, L. A., Murray, C. S., Simpson, B. M., Pipis, S. D., Kissen, P., Simpson, A., and Custovic, A. (2004). Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 433-439.
- Woodfolk, J. A. (2007). T-cell responses to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 119, 280-294; quiz 295-286.
- Wosinska-Becler, K., Plewako, H., Hakansson, L., and Rak, S. (2004). Cytokine production in peripheral blood cells during and outside the pollen season in birch-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 34, 123-130.
- Wu, K., Bi, Y., Sun, K., and Wang, C. (2007). IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 4, 269-275.
- Wurtzen, P. A., Lund, L., Lund, G., Holm, J., Millner, A., and Henmar, H. (2007). Chemical modification of birch allergen extract leads to a reduction in allergenicity as well as immunogenicity. *Int Arch Allergy Immunol* 144, 287-295.
- Wuthrich, B., Schindler, C., Leuenberger, P., and Ackermann-Liebrich, U. (1995). Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int Arch Allergy Immunol* 106, 149-156.
- Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21, 425-456.
- Yamaguchi, M., Lantz, C. S., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J. P., and Galli, S. J. (1997). IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 185, 663-672.
- Yamanaka, K., Yuta, A., Kakeda, M., Sasaki, R., Kitagawa, H., Gabazza, E. C., Okubo, K., Kurokawa, I., and Mizutani, H. (2009). Induction of IL-10-producing regulatory T cells with TCR diversity by epitope-specific immunotherapy in pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 124, 842-845 e847.
- Yilmaz-Demirdag, Y., Prather, B., and Bahna, S. L. (2009). Does heredity determine the allergy manifestation or the sensitisation to a specific allergen? *Allergol Immunopathol (Madr)*.
- Ying, S., Meng, Q., Barata, L. T., Robinson, D. S., Durham, S. R., and Kay, A. B. (1997). Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol* 158, 5050-5057.
- Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., and Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16, 3-10.
- Zhu, Z., Homer, R. J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G. P., Wang, J., Zhang, Y., and Elias, J. A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus

hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest 103, 779-788.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Oehen, S., Kundig, T., and Hengartner, H. (1997). Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. Immunol Rev 156, 199-209.

7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich,
dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer Immuntherapie mit
inhalativen Allergenen**

in der Klinik für Dermatologie und Allergologie
unter Leitung von PD Dr. W. Pfützner

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die
in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um
Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als
Dissertation vorgelegt.

Inhaltliche Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen
veröffentlicht:

„International Archives of Allergy and Immunology“
„Experimental Dermatology“
„Journal of Investigative Dermatology“
„Journal of Immunology“.

Gießen-Wieseck, im Juni 2010

Christian Möbs

8 Schriftenverzeichnis

Originalarbeiten

Christian Möbs, Caroline Slotosch, Harald Löffler, Thilo Jakob, Michael Hertl, and Wolfgang Pfützner

Birch Pollen Immunotherapy Leads to Differential Induction of Regulatory T Cells and Delayed Helper T Cell Immune Deviation. 2010; J Immunol, 184:2194-2203

Übersichtsarbeiten

Christian Möbs, Caroline Slotosch, Harald Löffler, Wolfgang Pfützner, Michael Hertl

Cellular and Humoral Mechanisms of Immune Tolerance in Immediate-Type Allergy Induced by Specific Immunotherapy. 2008; Int Arch Allergy Immunol, 147:171–178

Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Christian Möbs, Caroline Slotosch, Christian Veldman, Harald Löffler, Michael Hertl

Cellular Mechanisms of Tolerance Induction on specific Immunotherapy (SIT) with Aeroallergens. 2007; – World Immune Regulation Meeting (WIRM) I 2007, Davos

C. Möbs, C. Slotosch, C. Veldman, H. Löffler and M. Hertl

Cellular and humoral mechanisms of tolerance induction on specific immunotherapy (SIT) with birch pollen allergens. 2008; Exp Dermatol, 17(3):243 (P008) – XXXV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V. (ADF) 2008, Erlangen

Möbs Christian, Slotosch Caroline, Veldman Christian, Löffler Harald, Hertl Michael

Induction of Bet v 1-specific T regulatory cells and IgG4 antibodies by specific immunotherapy (SIT) with birch pollen allergens. 2008; – World Immune Regulation Meeting (WIRM) II 2008, Davos

Möbs Christian, Slotosch Caroline, Löffler Harald, Hertl Michael, Pfützner Wolfgang

Humoral and cellular mechanisms of tolerance induction in patients treated by specific immunotherapy (SIT) with birch pollen allergen. 2008; – 11th German Meeting on Th1/Th2 research 2008, Marburg

C. Möbs, C. Slotosch, H. Löffler, M. Hertl and W. Pfützner

Impact of specific immunotherapy and environmental birch pollen exposure on Bet v 1-specific humoral and cellular profiles in birch pollen allergics and healthy individuals. 2009; Exp Dermatol, 18(3):277 (P013) – XXXVI. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V. (ADF) 2009, Heidelberg

Möbs Christian, Slotosch Caroline, Löffler Harald, Hertl Michael, Pfützner Wolfgang

Impact of specific immunotherapy and environmental birch pollen exposure on Bet v 1-specific humoral and cellular profiles in birch pollen allergics and healthy individuals. 2009; – World Immune Regulation Meeting (WIRM) III 2009, Davos

Christian Möbs, Caroline Slotosch, Harald Löffler, Michael Hertl, Wolfgang Pfützner

Mechanismen der Toleranzinduktion bei Typ-I-Allergien. 2009; – ACUTE: Allergy Conference under one Umbrella and Talent Exchange - Workshop 2009, Hohenkammer

Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Hertl M, Pfützner W

Bet v 1-specific immune responses in specific immunotherapy-treated birch pollen allergic individuals during seasonal pollen exposure. 2009; J Invest Dermatol, 129 Suppl 2:S4 (P021) – 39th Annual European Society for Dermatological Research (ESDR) Meeting 2009, Budapest

C. Möbs, C. Slotosch, H. Löffler, M. Hertl and W. Pfützner

Specific immunotherapy leads to differential induction of cellular and humoral Bet v 1-specific immune responses in birch pollen allergic individuals. 2010; Exp Dermatol, 19(2):169 (P014) – XXXVII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V. (ADF) 2010, Lübeck

9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Professoren, Doktoren und Dozenten

In Gießen:

Askani, Baniahmad, Bindereif, Clauß, Czok, Eichelberg, Ekschmitt, Esser, Evguenieva-Hackenberg, Felle, Forchhammer, Forreiter, Friedhoff, Friedrich, Gerlich, Götting, Gregor, Grünhage, Häusler, Hahn, Handa, Hipke, Hughes, Ipaktschi, Jäger, Jauker, Jeltsch, Jost, Klug, Kreutz, Kröger, Kunter, Kunze, Laqua, Meiß, Munz, Nowak, Pahlich, Pingoud A, Pingoud V, Renkawitz, Ringe, Roth, Schnetter, Schulte, Schultka, Schwartz, Trenczek, Treuner-Lange, Uhlig, van Bel, Wagner, Wende, Werding, Wolf, Wollnik, Wolters, Zeller.

10 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei:

Prof. Dr. M. Hertl	für die Themenvergabe und damit für die Möglichkeit zur Promotion in einem sehr interessanten Gebiet, die freundliche und motivierende Unterstützung und für das in mich gesetzte Vertrauen.
PD Dr. W. Pfützner	für die ausgezeichnete Betreuung, die unkomplizierte Zusammenarbeit, die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die generelle Hilfe, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.
Prof. Dr. H. Löffler	für die Planung und Vorbereitung dieser Studie sowie für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit.
den ärztlichen und technischen Mitarbeitern der Hautklinik Marburg	für die Rekrutierung der Patienten, die Durchführung der benötigten Blutentnahmen und die Erhebung der klinischen Parameter im Rahmen dieser Studie. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Caroline Slotosch, Sigrid Wagenknecht und Sabine Weimer für den reibungslosen Ablauf und die nette Zusammenarbeit bedanken.
Prof. Dr. T. Jakob	für die Bestimmung allergenspezifischer Antikörper, die fachlichen Ratschläge sowie die in diesem Rahmen und beim Verfassen der Publikation große Hilfsbereitschaft.
PD Dr. H.-H. Müller	für die schnelle und aufschlussreiche statistische Beratung.

Ein außerordentlicher Dank geht an die Patienten der Hautklinik Marburg, die durch ihre Teilnahme an dieser Studie und ihre Kooperation erst die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken. Mein spezieller Dank geht an Dr. Angela Nagel, die mich mit zahllosen fachlichen Ratschlägen, Diskussionen und Anregungen auch über den Laboralltag hinaus freundschaftlich durch die letzten Jahre begleitete, sowie an Eva Podstawa und Dr. Rüdiger Eming für die angenehme wissenschaftliche und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Ohne ihre Unterstützung, das Vertrauen, die Motivation (Danke Steffen!) und ihre grenzenlose Geduld (Danke Minke!) wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme!